



ANA PAULA REBELLATO

**“BISCOITOS ELABORADOS COM FARINHAS DE TRIGO
FORTIFICADAS COM FERRO: TEOR DO MINERAL E QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICA DURANTE A ESTOCAGEM”**

**Campinas - SP
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ANA PAULA REBELLATO

**“BISCOITOS ELABORADOS COM FARINHAS DE TRIGO FORTIFICADAS
COM FERRO: TEOR DO MINERAL E QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE
A ESTOCAGEM”**

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de
Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA, ANA PAULA REBELLATO
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE

Assinatura do Orientador

Campinas - SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

R241b Rebellato, Ana Paula 1977-
Biscoitos elaborados com farinhas de trigo fortificadas
com ferro: teor do mineral e qualidade físico-química
durante a estocagem / Ana Paula Rebellato. -- Campinas,
SP: [s.n], 2012.

Orientador: Juliana Azevedo Lima-Pallone.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ferro. 2. Biscoitos. 3. Espectrometria de absorção
atômica com chama. 4. Validação. 5. Anemia. I. Lima-
Pallone, Juliana Azevedo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biscuits produced with wheat flours fortified with iron:
mineral content and physicochemical quality during the storage period
Palavras-chave em inglês (Keywords):

Iron

Biscuits

Flame atomic absorption spectrometry

Validation

Anemia

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliana Azevedo Lima-Pallone [Orientador]

Helena Teixeira Godoy

Alessandra Borin

Data da defesa: 31/08/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

.....
Profª. Dra. Juliana Azevedo Lima-Pallone
(Presidente)

.....
Dra. Helena Teixeira Godoy
(Titular)

.....
Dra. Alessandra Borin
(Titular)

.....
Dr. Rodrigo Ramos Catharino
(Suplente)

.....
Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
(Suplente)

Campinas-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos amores da minha vida,
meu marido Rudi, pelo companheirismo e apoio e
a minha filha Luisa, amor da minha vida.
Obrigada pelo apoio, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Juliana, pela orientação, incentivo e amizade. Obrigada pela oportunidade, por confiar em mim no início do trabalho, quando tudo isso era apenas um sonho.

Aos professores da banca examinadora, Dra. Helena Teixeira Godoy, Dra. Alessandra Borin, Dr. Rodrigo Ramos Catharino e Dr. Edenir Pereira Filho, pelas valiosas correções e sugestões que colaboraram muito para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus pais, Rafael e Neide, por todo o amor, carinho e por me apoiarem e colaborarem para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha irmã e sobrinha, Fabiana e Julya, minhas companheiras, presentes em todas as etapas da minha vida.

Ao meu companheiro, marido, amigo de todas as horas, Rudi. Não existem palavras que descrevam meu agradecimento. Obrigada pela paciência, pelo apoio e dedicação para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha filha Luisa, amor da minha vida.

A todos os meus amigos. Obrigada pelo apoio, compreensão e momentos de diversão.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos da FEA/UNICAMP. Lucíula, Juliana, Alice, Daniela. Obrigada por todos os ensinamentos, auxílio, companhia, almoços, choros e risadas! Em especial à Juzinha, por ter sido minha madrinha neste laboratório, me ajudou muito com todo o seu conhecimento, paciência e boa vontade, muito obrigada!!! A Luciula pela companhia, pela paciência e amizade. As estagiárias, Gabi, Suelen, Bruna, Cris, Letícia, em especial à Beatriz e Jujuzinha (as Pauletes), obrigada pela ajuda. A Grasi, Natália, Gabi e as alunas do Prof. Marcelo, obrigada pela companhia.

Aos professores Dr. Marcelo A. Prado e a Dra. Helena Teixeira Godoy, agradeço pelo incentivo, apoio e também pelas brincadeiras.

Aos funcionários e colaboradores do CECI, em especial as professoras Vânia, Celina e Laura por cuidarem tão bem da minha Luisa.

Ao Seu Dirceu, pelo exemplo de profissional dedicado e sempre disposto a ajudar.

Seu trabalho foi inestimável e facilitou a condução dos meus experimentos. Às técnicas do Laboratório de Análise de Alimentos, Mirian e Renata, por todo o apoio, não apenas em questões técnicas, mas de convivência também.

Aos muitos colaboradores da Unicamp que me ajudaram nas diversas etapas deste trabalho.

Agradecimentos especiais ao Cosme e Marcão (secretaria de pós), Jardete e Guiomar (secretaria do DCA), Jonas (xerox FEA) e aos funcionários da Biblioteca da FEA.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me dedicaram afeto, energia positiva, torceram e contribuíram para que tudo isto fosse possível!

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela provação do projeto (processo nº 2009/50730-0) cujo financiamento tornou possível a aquisição dos materiais e reagentes para a realização dos experimentos desta dissertação.

Muito obrigada!

Ana Paula

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xiii
SUMMARY.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	xvii
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	xx
CAPÍTULO 1: Ferro: importância para a saúde, fortificação e qualidade físico-química de alimentos.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Ferro e suas funções.....	2
2. Fontes de ferro.....	3
3. Fortificação de alimentos com ferro.....	3
4. Consumo e formulação de biscoito elaborado com farinha de trigo fortificada.....	6
5. Ferro e seu potencial oxidante.....	7
6. Parâmetros de qualidade associados a farinha fortificada com ferro.....	9
7. Degradação de lipídeos em alimentos.....	11
8. Métodos para a determinação de ferro.....	12
9. Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2: Método analítico para determinação de ferro por FAAS: validação e aplicação em amostras de biscoitos.....	20
Resumo.....	21
Abstract	22
1. Introdução.....	23
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1 Reagentes e Soluções.....	26
2.2 Equipamentos e vidrarias.....	26
2.3 Limpeza de vidrarias.....	27
2.4 Amostras.....	27
2.5 Mineralização das amostras.....	27

2.6 Determinação de ferro por FAAS.....	28
2.7 Validação dos métodos analíticos.....	28
2.8 Análises de carbono residual.....	31
2.9 Análise estatística.....	32
3. Resultados e Discussões.....	33
3.1 Validação de método para análise de ferro em biscoitos.....	33
3.1.1 Avaliações da linearidade e sensibilidade através de padronização externa.....	33
3.1.2 Repetitividade e recuperação utilizando MRC NIST 1567a (farinha de trigo).....	35
3.1.3 Precisão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de ferro em biscoito por FAAS.....	36
3.2 Quantificação do teor de ferro em biscoito por FAAS	40
4. Conclusão.....	46
5. Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 3: Caracterização físico-química de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro.....	50
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1. Introdução	53
2. Materiais e Métodos.....	55
2.1 Reagentes e Soluções.....	55
2.2 Equipamentos e Vidrarias.....	55
2.3 Limpeza das vidrarias.....	56
2.4 Amostras.....	57
2.5 Determinação de umidade e avaliação da repetitividade em amostras de biscoito.....	57

2.6 Determinação de acidez álcool solúvel.....	58
2.6.1 Avaliação da precisão da metodologia para determinação de acidez álcool solúvel.....	59
2.7 Determinação do índice de peróxidos.....	59
2.7.1 Validação da metodologia para a determinação de índice de peróxidos....	60
2.8 Determinação do teor de lipídeos.....	61
2.9 Determinação do teor de ferro em biscoitos por FAAS.....	62
2.10 Análise estatística.....	63
3. Resultados e Discussões.....	64
3.1 Determinação de umidade e avaliação da repetitividade em amostras de biscoitos.....	64
3.2 Avaliação da precisão e determinação de acidez álcool solúvel em amostras de biscoitos.....	68
3.2.1 Avaliação da precisão.....	68
3.2.2 Determinação de acidez álcool solúvel em amostras de biscoitos.....	70
3.3 Índice de Peróxido.....	73
3.3.1 Validação da metodologia para determinação do índice de peróxido.....	73
3.3.1.1 Avaliação da repetitividade e precisão intermediária em biscoitos.....	73
3.3.1.2 Estimativas do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)....	75
3.3.2 Determinação do índice de peróxido em amostras de biscoitos.....	76
3.4 Teor de lipídeos em biscoitos.....	79
3.5 Determinação de ferro em amostras de biscoitos por FAAS.....	81
4. Conclusão.....	86
5. Referências Bibliográficas.....	87
Conclusões Gerais.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Ferro: importância para a saúde, fortificação e qualidade físico-química de alimentos..... 1

Tabela 1: Impactos da fortificação de alimentos com ferro..... 4

Tabela 2: Formulação básica para alguns tipos de biscoitos..... 7

CAPÍTULO 2: Método analítico para determinação de ferro por FAAS: validação e aplicação em amostras de biscoitos..... 20

Tabela 1: Valores de absorbância para cada concentração de solução padrão de ferro para a construção da curva de calibração..... 33

Tabela 2. Teor de ferro medido na amostra de farinha de trigo (MRC)..... 35

Tabela 3. Teor de carbono residual em amostras de biscoitos..... 36

Tabela 4. Valores de precisão, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de ferro em biscoitos.... 37

Tabela 5. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária..... 38

Tabela 6. Teor de ferro em amostras de biscoitos..... 42

Tabela 7. Teor médio de ferro para as diferentes marcas de biscoitos..... 44

CAPÍTULO 3: Caracterização físico-química de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro..... 50

Tabela 1. Umidade dos biscoitos medida em condições de repetitividade..... 64

Tabela 2. Valores da umidade (expresso em %) em amostras de biscoitos durante o período de estocagem..... 66

Tabela 3. Valor de acidez determinados em condições de repetitividade e precisão intermediária para os tipos de biscoito..... 69

Tabela 4. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária..... 70

Tabela 5. Valores de acidez álcool solúvel (expresso em mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100 g⁻¹) em amostras de biscoitos durante o período de estocagem..... 71

Tabela 6. Valores de repetitividade e precisão intermediária para determinação de peróxido em biscoitos.....	74
Tabela 7. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária.....	75
Tabela 8. Valores de peróxidos em amostras de biscoitos durante o período de estocagem.....	77
Tabela 9. Teor de lipídeos (expresso em %) em amostras de biscoitos.....	80
Tabela 10. Teor de ferro em amostras de biscoito durante o período de estocagem.....	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: Método analítico para determinação de ferro por FAAS:

validação e aplicação em amostras de biscoitos.....	21
Figura 1: Curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do teor ferro nas amostras de biscoito.....	34
Figura 2. Gráfico dos resíduos.....	34
Figura 3. Curva analítica para determinação do limite de detecção e quantificação para quantificação do teor ferro em amostras de biscoito.....	39
Figura 4. Gráfico dos resíduos referente ao LD e LQ.....	40

RESUMO GERAL

No Brasil a ANVISA através da Resolução nº 344 de 2002, instituiu a obrigatoriedade do enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. A deficiência de ferro é apontada como a principal causa da anemia ferropriva. A fortificação de alimentos com ferro é a estratégia indicada pelas instituições que atuam na área de saúde como a mais eficiente para o combate à anemia. Entretanto, a ingestão excessiva deste mineral está associada a danos oxidativos e tem sido relacionada com a manifestação de várias doenças. Dessa forma, o alcance dos objetivos dos programas de fortificação de alimentos está relacionado à garantia da ingestão recomendada para os nutrientes adicionados e aos atributos físico-químicos, que devem ser monitorados no veículo utilizado e no produto final. Este trabalho teve como objetivos adequar e validar uma metodologia para a determinação de ferro em amostras de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com chama e acompanhar os parâmetros físico-químicos (umidade, acidez, índice de peróxido e teor de lipídeos) durante o período de estocagem (150 dias). O método para determinação do teor de ferro em biscoitos foi validado para os parâmetros precisão, seletividade, recuperação, sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e se mostrou adequado. O teor médio de ferro presente nos biscoitos tipo cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado foram: 5,0 a 8,6; 5,3 a 7,8; 2,5 a 6,8; 3,7 a 5,7 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Foi verificada diferença significativa entre lotes de mesma marca e entre marcas do mesmo tipo, através da ANOVA e do Teste de Tukey (p<0,05). Para os parâmetros físico-químicos, os valores obtidos ao longo do período de estocagem variaram; umidade de 1,8 a 6,3%; acidez de 1,5 a 7,4 mg NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100g⁻¹; índice de peróxido de valor não detectado (nd) a 95,1 meq Kg⁻¹ de gordura. Para o teor de lipídeos e ferro, o menor e o maior valor encontrado foram 9,8 e 18,0% e 2,1 e 9,2 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Foi possível verificar que existe diferença significativa entre os valores obtidos para cada lote de mesma

marca ao longo do período de estocagem. Nenhum tipo de correlação entre a umidade e os valores de acidez presentes nas matrizes, foi observado, da mesma forma que não foi verificada nenhuma correlação entre o índice de peróxido e o teor de ferro. Notou-se que há necessidade de melhorar a qualidade dos ingredientes utilizados no preparo dos biscoitos a fim de manter um padrão de qualidade uniforme durante todo o período de validade. As variações observadas no teor de ferro indica a necessidade de uma legislação mais específica, estabelecendo concentrações (mínima e máxima) para o mineral utilizado na fortificação de farinha de trigo que estará presente em alimentos prontos para o consumo, a fim de garantir o sucesso da campanha de fortificação.

SUMMARY

Through the resolution no. 344 of 2002, ANVISA (Brazilian Regulatory Institute) assigned the obligation of enriching wheat and corn flours with folic acid and iron. Iron deficiency is pointed out as the main cause of anemia, so food fortification with this mineral is the most efficient strategy indicated by the health institutions that work towards the combat of anemia. However, excessive ingestion of this mineral is associated with oxidative damages and has also been related to the occurrence of several diseases. So the fortification programs must guarantee the recommended intake, and not more than that, as well as to maintain the physicochemical attributes, by monitoring both the vehicle of fortification and the final product. This work redesigned and validated one methodology for iron determination in samples of biscuits produced with fortified wheat flour, by using Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). It also measured physicochemical parameters (moisture, acidity, peroxide index and fat content) during the storage period (150 days). The method for iron determination in biscuits is shown to be adequate and was validated for the parameters precision, sensibility, selectivity, recovery, accuracy, linearity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). The iron content in biscuits of the types cream cracker, salt and water, cornstarch cookies (maizena) and butter cookies were, respectively: 5.0 to 8.6, 5.3 to 7.8, 2.5 to 6.8, and 3.7 to 5.7 mg 100 g⁻¹. ANOVA and Tukey tests (p<0,05) were applied to verify if there was significant difference between batches of the same brand and among the brands of the same type of biscuits. For the physicochemical parameters, all the values obtained throughout the storage period varied. Moisture was from 1.8 to 6.3%; acidity was from 1.5 to 7.4 mg NaOH (0,1 mol.L⁻¹) 100 g⁻¹; peroxide index was from non-detectable (nd) to 95.1 meq Kg⁻¹ of fat. The lowest and the highest values for fat content were 9.8 and 18% the range for iron was from 2.1 to 9.2 mg 100 g⁻¹ for iron. There was significant difference between the values obtained for each batch of the same brand throughout the storage period.

But there was no correlation between the moisture present in the matrix and the acidity values, neither there was between the peroxide index and iron content.

It is necessary for the industries of biscuits to improve the stability of the ingredients to maintain uniformity during all the storage period. The observed variation of iron content indicates the need for a more specific legislation, which establishes minimum and maximum concentrations for the mineral added to fortify wheat flour, aiming to guarantee the success of the fortification campaign.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução nº 344 de 13 de dezembro de 2002 determinou o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico ($150 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e ferro ($4,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia, já que essas farinhas são largamente consumidas pela população (ANVISA, 2002).

A fortificação de alimentos com ferro é a estratégia indicada pelas instituições que atuam na área de saúde como a mais eficiente para o combate à anemia ferropriva. A deficiência de ferro é o problema nutricional mais comum em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2002, foram contabilizados 2 bilhões de anêmicos, sendo a maioria por deficiência de ferro. O risco de deficiências é maior quando os requerimentos de ferro são maiores como na primeira infância, adolescência e durante a gestação (Lynch, 2005). Ingestão inadequada e consumo de alimentos com baixa biodisponibilidade de ferro são identificados como as principais causas de carências (Cozzolino, 2005).

A obrigatoriedade da fortificação de farinhas com ferro, combinado ao consumo de alimentos ricos em promotores para sua absorção, como carnes e frutas cítricas, ajudaram os países desenvolvidos a reduzirem a deficiência de ferro e, conseqüentemente, a anemia de forma significativa (Hurrell e Jacobs, 1996). O regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais publicado pela ANVISA (2005) indica o consumo de 14 mg de ferro para adultos, 9 mg para crianças e 27 mg para gestantes.

Por outro lado, o ferro tem sido apontado como um dos promotores do estresse oxidativo e de estar associado a doenças que estão relacionadas aos processos oxidativos como Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e catarata, entre outras (Ferreira e Matsubara, 1997). Além disso, estudos realizados por diversos pesquisadores, indicaram que a suplementação com ferro pode comprometer o aproveitamento de outros minerais no organismo humano (Pedrosa e Cozzolino, 1993; Lobo e Tramonte, 2004).

Além do aspecto nutricional, o alcance dos objetivos dos programas de fortificação de alimentos está relacionado aos atributos físico-químicos, que devem ser monitorados no veículo utilizado para a adição de nutriente e no produto final. Huma et al. (2007) verificaram que durante a estocagem de farinhas fortificadas com ferro foi observada oxidação de lipídeos e desenvolvimento de rancidez, ocasionados pela adição de ferro.

Soeiro et al (2010) em estudo realizado observaram que a concentração de ferro encontrado nas farinhas de trigo estudadas variaram de 5,1 a 9,4 mg 100 g⁻¹ (em média 7,4 mg 100 g⁻¹), valores estes superiores aqueles indicados pela resolução n° 344 (4,2 mg 100 g⁻¹). É importante destacar que as farinhas de trigo fortificadas serão utilizadas como ingrediente para o preparo de diversos alimentos, incluindo pães, massas, bolos, biscoitos, entre outros.

Doner & Ege (2004) determinaram ferro por FAAS, em três tipos de biscoitos comercializados na Turquia e encontraram 11,0 a 15,9 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo infantil, 1,2 a 4,6 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo “petit beurre” e 1,5 a 1,8 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo salgado. Iwegbue (2012) analisou metais em amostras de biscoitos consumidos na Nigéria, e os teores de ferro encontrados nas amostras variaram de 3,3 a 10,9 mg 100 g⁻¹. O biscoito tipo cream cracker apresentou teor médio de ferro de 10,9 mg 100 g⁻¹ (0,35 a 36,4 mg 100g⁻¹).

Dada a importância da ingestão de alimentos fortificados com ferro, há necessidade de desenvolver e validar metodologias analíticas, bem como a realização de estudos que determinem a concentração do mineral e os parâmetros físico-químicos desses alimentos. No momento, não existem estudos que tenham determinado o teor de ferro e avaliado os parâmetros de qualidade em biscoitos comercializados no Brasil. Assim, os objetivos deste trabalho foram otimizar, validar e aplicar uma metodologia para análise do teor de ferro em biscoito por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) e avaliar os parâmetros físico-químicos (umidade, acidez, peróxido e lipídeos) durante o período de 150 dias de estocagem. Além disso, foi realizada análise estatística a fim de verificar

se há diferença significativa no teor de ferro de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada entre lotes de mesma marca e entre marcas do mesmo tipo e se há diferença entre os parâmetros de qualidade avaliados durante o período de estocagem, a fim de garantir a ingestão adequada de ferro bem como manter os padrões de qualidade durante todo o período de validade deste tipo de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 269, **2005**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole, v. 1. 878 p. **2005**.

DONER, G., EGE, A., Evaluation of digestion procedures for the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 520, p. 217 – 222, **2004**.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras*; 43:61-68; **1997**.

HUMA, N., REHMAN, S.U., AWAN, J.A., MURTAZA, M.A., ARSHAD, M.U. Effect of packaging material on the quality of iron-fortified wholemeal flour during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, v 31, 659 - 670, **2007**.

HURRELL, R.F., JACOBS, S. The role of the food industry in iron nutrition. Iron intake from industrial food products. In: Hallberg L., Asp., N. Iron nutrition in health and disease. England: John Libbey & Company Ltd., 341-346, **1996**.

IWEGBUE, C.M.A., Metal contents in some brands of biscuits consumed in Southern Nigeria. *American Journal of Food Technology*. V. 7(3): p. 160 – 167, **2012**.

LOBO A.S., TRAMONTE V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais, *Revista Nutrição*, 17(1): 107-113, **2004**.

LYNCH, S. R. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 18, p. 333 - 346, **2005**.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. *Revista Saúde Pública*, v. 27, n. 4, p.266-270, **1993**.

SOEIRO, B. T., BOEN, T. R., PEREIRA-FILHO, E. R., LIMA-PALLONE, J. A., Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por

Componentes Principais (PCA). Ciência e Tecnologia de Alimentos; Campinas, 30(3): 618-624, **2010**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Worldwide prevalence of anaemia, 1993 – 2005, p. 51.

CAPÍTULO 1

Ferro: importância para a saúde, fortificação e qualidade físico-química de alimentos

Ana Paula Rebellato, ¹ Juliana Azevedo Lima Pallone

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ferro desempenha funções no organismo relacionadas a reações de oxidação e transporte de oxigênio e é essencial para a prevenção da anemia ferropriva, um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Entretanto, o excesso desse composto inorgânico pode ser responsável pela geração de radicais livres e processos oxidativos negativos que podem ocorrer no corpo humano e nos alimentos.

No Brasil, desde 2002 farinhas são fortificadas com ferro. A qualidade dos alimentos elaborados com essas farinhas fortificadas ainda não foi estudada.

Nessa revisão bibliográfica será apresentada a importância do ferro para a saúde, seus efeitos adversos e a relação com a qualidade físico-química de alimentos.

1. Ferro e suas funções

O ferro é um mineral essencial para a homeostase celular. É fundamental para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Um indivíduo adulto possui de 4 a 5 g de ferro no organismo, sendo que 2,5 g na forma de hemoglobina. A deficiência de ferro acarreta consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais importante. Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente prejudicial para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lipídeos e o DNA. Dessa forma, é necessário que haja um equilíbrio no seu metabolismo, de modo que não haja falta nem excesso de ferro no organismo. A homeostase possibilita, portanto a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evita possíveis danos teciduais (Wijayanti et al, 2004; Fairbanks e Beutler, 2004).

2. Fontes de ferro

Existem duas formas de ferro disponíveis naturalmente: heme e não heme. O ferro heme, derivado da hemoglobina, é encontrado em alimentos de origem animal, tais como carnes vermelhas, peixes, frutos do mar (ostras, camarões e caranguejo) e aves. O ferro não heme, proveniente de alimentos de origem vegetal são encontrados em verduras de folhas escuras (brócolis, couve e espinafre), leguminosas, grãos (feijões, lentilha, soja e outros) e cereais (Hurrell, 1997; Mahan e Arlin, 2002; Cozzolino, 2005).

3. Fortificação de alimentos com ferro

A ingestão de alimentos que foram fortificados com ferro é uma forma alternativa de suprir a necessidade desse mineral na alimentação. As farinhas de trigo e milho e seus subprodutos (pães, bolos, biscoitos, massas) são exemplos desses alimentos. É uma prática aceita e empregada pelos processadores de alimentos desde a metade do século XX e tem como objetivo reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou vários nutrientes (ANVISA, 2002). Dentre os compostos adicionados aos alimentos, com o intuito de compensar as perdas do processamento ou mesmo reforçar o conteúdo nutritivo, encontram-se as vitaminas, minerais e aminoácidos (Carvalho, 1996).

Os produtos lácteos e os cereais são considerados os principais veículos para serem fortificados com ferro, pois, apresentam vantagens por serem muito consumidos e adaptados à alimentação de adultos e crianças (Hurrell et al., 1997). Muitos problemas relacionados à deficiência de ferro já foram reduzidos com a fortificação de alimentos, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Impactos da fortificação de alimentos com ferro.

País	Tipo de Alimento	Espécie de Ferro	Nº Pessoas Envolvidas	Resultado	Referência
Chile	Leite em pó	Sulfato ferroso	229 crianças; 3 meses	Redução da anemia	Hertrampf et al., 1990
Chile	Farinha de arroz	Hemoglobina bovina 5%	239 crianças; 3 meses	Redução da anemia	Hertrampf et al., 1990
Chile	Biscoito de farinha trigo	Hemoglobina bovina 6%	427 crianças pré-escola; 6 a 12 anos	Aumento de nível de ferritina	Olivares et al., 1990
Chile	Cereal de arroz	Ferro eletrolítico	515 crianças; 4 meses	Redução da anemia	Walter et al., 1993
Brasil / SP	Leite em pó	Ferro elementar	335 crianças; < 2 anos	Redução da anemia	Torres et al., 1995
Guatemala	Açúcar	FeNaEDTA	346 crianças; 1 a 8 anos	Redução da anemia	Viteri et al., 1995
Venezuela	Farinha de trigo e milho	Fumarato ferroso	317 crianças; 7, 11 e 15 anos	Redução da anemia	Layrisse et al., 1996
Brasil / SP	Leite	Ferro aminoácido quelato	269 crianças; 6 a 42 meses	Redução de anemia	Torres et al., 1996
Chile	Fórmula lácteas	Hemoglobina bovina	835 lactentes; 6 meses	Redução da anemia	Walter et al., 1998
Indonésia	Balas	Ferro elementar	117 crianças; 4 a 6 anos	Redução da anemia	Sari et al., 2001
Brasil / SP	Pão doce	Ferro bisglicina quelato	89 crianças; 12 a 72 meses	Redução da anemia	Giorgini et al., 2001
Brasil / SP	Açúcar	Ferro bisglicina quelato	93 crianças; 10 a 48 meses	Redução da anemia	De Paula et al., 2001
Brasil / AM	Farinha de mandioca	Ferro aminoácido quelato	80 crianças; 2 a 6 anos	Redução da anemia	Tuma et al., 2003
Brasil / PR	Bebida de	Ferro bisglicina	467 crianças;	Redução da	Miglioranza et

	soro de queijo	quelato	7 a 14 anos	anemia	al., 2003
Sri Lanka	Farinha de trigo	Ferro eletrolítico ou reduzido	Crianças e mulheres não grávidas	Não houve redução anemia	Nestel et al., 2004
China	Molho de soja	NaFeEDTA	14 mil participantes	Redução da anemia	Chen et al., 2005
África do Sul	Pão	Ferro eletrolítico e bisglicina quelato	160 crianças; 4 a 11 anos	Redução da anemia para o grupo que recebeu Fe bisglicina	van Stuijvenberg et al., 2006
Brasil / RS	Farinha de trigo e milho	Conforme legislação	746 crianças; < 6 anos	Sem alteração no nível de hemoglobina	Assunção et al., 2007
Brasil / SP	Pão	Sulfato ferroso microencapsulado	Crianças pré-escolares	Aumento nível hemoglobina	Barbosa, TNN, 2007
Quênia	Farinha de milho	Ferro eletrolítico e NaFeEDTA	516 crianças de 3 a 8 anos	Aumento nível hemoglobina para NaFeEDTA	Andang'o et al., 2007
Brasil / MG	Arroz enriquecido	Pirofosfato de ferro	195 crianças; 6 e 24 meses	Redução da anemia	Pessoa, MC., 2009
Brasil / RJ	Arroz fortificado	Ferro quelato	354 crianças; 12 a 60 meses	Redução da anemia	Bagni et al, 2009

Alguns dados sobre a concentração de ferro em farinhas fortificadas comercializadas no Brasil já foram publicados. Boen et al. (2007 e 2008) avaliaram o teor de ferro em diferentes amostras de farinhas produzidas no Brasil, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama e encontraram uma variação no teor de ferro de 4,1 a 10,0 mg 100 g⁻¹ em 30 amostras e de 2,5 a 10,0 mg 100 g⁻¹ em 70 amostras, comercializadas na cidade de Campinas – SP. Druzian et al. (2006) avaliaram o teor de ferro em flocos de milho comercializados em Salvador - BA e encontraram uma variação de 7,6 a 10 mg 100 g⁻¹ em 3 diferentes marcas avaliadas. Os valores obtidos para as amostras de farinhas avaliadas nos trabalhos indicaram que o teor de ferro variou em grande proporção. Vale destacar que, parte das amostras continha maior concentração do mineral, quando comparado ao valor indicado pela legislação brasileira.

4. Consumo e formulação de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificadas

O consumo de biscoito pela população brasileira foi de 4,8 kg/pessoa/ano de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar 2009 (IBGE, 2008 - 2009).

Já, dados do Sindicato das Indústrias de Massas Alimentícias e Biscoitos do Estado de São Paulo (SIMABESP, 2009) indicam que o Brasil produziu 1.206 milhões de toneladas de biscoito, sendo o segundo maior produtor mundial. Entre os anos de 2007 e 2009 o consumo *per capita* anual de biscoitos foi de 6,3 kg, sendo que 30% correspondem aos biscoitos recheados, 25% crackers e água e sal, 10% wafers, 10% maria e maisena, 8% doces secos, 7% amanteigados, 6% salgados, 2% rosquinhas e 2% outros.

Os biscoitos e o “crackers” são produzidos em maior variedade do que qualquer outro tipo de produto de panificação e o que difere entre eles é a proporção dos ingredientes utilizados na formulação como farinha, água, açúcar, gordura ou manteiga e outros ingredientes menores (fermento químico ou biológico, malte, sal, leite, etc), conforme demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Formulação básica para alguns tipos de biscoitos

Ingredientes	manteiga (%)	maisena (%)	cream cracker / água e sal (%)
Açúcar	29	20	-
Melaço	-	5,5	-
Xarope milho	7	-	-
Manteiga	18	-	-
Gordura	-	18	11
Ovos	-	3,5	-
Fermento	-	-	0,4
Água	20	20	44
Malte	-	-	1,5
Sal	-	-	1,5
Bicarbonato	-	-	0,6

em base de farinha (%)

Basicamente o que difere os biscoitos tipo água e sal dos “crackers” é que este último precisa do uso de fermento biológico e, geralmente, de longos períodos de fermentação. As alterações físicas e químicas que ocorrem durante o processo fermentativo (“massa esponja”) é o responsável pelo sabor típico e a textura desse tipo de biscoito (El-Dash et al, 1982).

As principais etapas do processo de produção de biscoitos são:

Mistura → Formação do biscoito → Cozimento → Resfriamento → Empacotamento

5. Ferro e seu potencial oxidante

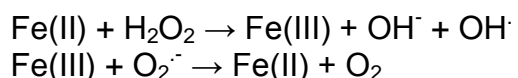
O ferro apresenta facilidade em catalisar reações de radicais livres, formando oxidantes tóxicos que podem causar danos às células e tecidos (Worwood, 1996). Os danos induzidos pelos radicais livres podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e as vitaminas presentes nos alimentos.

De acordo com Gaucheron (2000) sais de ferro produzem oxidação de lipídeos e sais na forma de complexos são menos eficientes para esse processo, em decorrência da menor reatividade do átomo de ferro no composto de

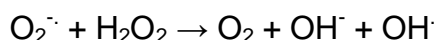
coordenação, que ocasiona menor disponibilização do metal para a participação nessas reações. Mendes et al. (2008) verificaram que a estabilidade oxidativa de leites em pó fortificados com ferro, expressa pelo índice de TBA (ácido tiobarbitúrico), foi influenciada pela adição do mineral. Os pesquisadores verificaram também que o ferro aminoácido quelado ocasionou menor oxidação de lipídeos, quando comparado ao sulfato ferroso. Por outro lado, Li et al. (2008) analisaram o processo de adição de vitaminas e minerais a um tipo de arroz e verificaram que formulações contendo ferro-EDTA, após estocagem por 32 semanas, desenvolveram rancidez.

Além disso, o estudo sobre o mecanismo de lesão oxidativa no organismo humano tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a essas lesões. O ferro é o metal mais capacitado para catalisar as reações de oxidação das biomoléculas (Aust et al., 1991). As reações de Fenton e Harber-Weiss descrevem a participação do ferro nos danos oxidativos *in vitro*.

Reação de Fenton



Reação de Harber-Weiss



O processo de lipoperoxidação pode ser iniciado por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos (Borg et al., 1987).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a manifestação de várias doenças, incluindo enfisema, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata, cardiopatias, artrite e diabetes, entre outras (Bianchi et al., 1999). Os danos causados ao DNA também desempenham papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Poulsen et al., 1998, Barbosa et al., 2006).

6. Parâmetros de qualidade associados a farinhas fortificadas com ferro

O alcance do sucesso de um programa de fortificação de alimentos deve levar em consideração além dos impactos apresentados em estudos epidemiológicos, as mudanças físico-químicas que podem ocorrer no veículo utilizado para fortificação e o produto final. Akhtar et al. (2009) avaliaram os efeitos da fortificação de farinhas com ferro e zinco nas propriedades reológicas de farinhas de trigo e concluíram que a adição de ferro-EDTA, ferro elementar, sulfato de zinco e óxido de zinco não mostraram nenhuma alteração crítica na composição das farinhas. Pouquíssimas diferenças, em vários parâmetros, relacionados à reologia foram detectados e alta capacidade de absorção de água foi observada. Alterações nesse parâmetro em farinhas fortificadas podem ser relacionadas a mudanças no teor de umidade, concentração de farelo, conteúdo de proteínas, amido danificado e atividade enzimática. Os atributos de tempo de desenvolvimento da massa e tempo de estabilidade não foram modificados nas farinhas fortificadas.

Rehman et al (2006) avaliaram a estabilidade de íons ferrosos em farinha de trigo, com base na importância das características físico-químicas e sensoriais na qualidade de pães. Nesse trabalho foi utilizada farinha fortificada com pré-mix contendo sulfato ferroso, ferro-EDTA e ácido fólico em diferentes concentrações. Os pesquisadores observaram que durante a estocagem da farinha de trigo fortificada o teor de ferro não sofreu alteração, entretanto, houve a diminuição de íons ferrosos e formação de íons férricos, como resultado do processo de oxidação. As farinhas foram estocadas por 42 dias e a maior conversão de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) ocorreu nas quatro primeiras semanas de estocagem. Nesse aspecto, vale destacar que os íons Fe^{3+} apresentam menor biodisponibilidade, quando comparados aos íons Fe^{2+} . Verificou-se também que a concentração de ferro nas farinhas afetou algumas características sensoriais, exceto gosto e aroma. Os autores destacaram que a estocagem de farinhas fortificadas com ferro, além de 42 dias poderá acarretar em efeitos adversos às características sensoriais de pães.

Na mesma época, Huma et al. (2007) estudaram o efeito do tipo de embalagem na qualidade de farinhas fortificadas com ferro durante 42 dias de estocagem. Foram utilizadas amostras contendo sulfato ferroso (30 mg Kg^{-1}), combinação de sulfato ferroso e ferro-EDTA (20 e 20 mg Kg^{-1}) e farinhas fortificadas com ferro elementar (60 mg Kg^{-1}). Todas as farinhas também foram enriquecidas com $1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ de ácido fólico. Os parâmetros umidade, acidez e índice de peróxido aumentaram durante o período avaliado, enquanto os teores de proteínas e lipídeos diminuíram. Constatou-se também conversão de íons Fe^{2+} a Fe^{3+} durante a estocagem, principalmente nas farinhas contendo sulfato ferroso. Farinhas contendo ferro elementar apresentaram maior conservação dos íons ferrosos. As farinhas que continham sulfato ferroso apresentaram maior aceitação, com base nas características sensoriais. Os pesquisadores concluíram que a estabilidade das farinhas fortificadas com ferro depende da forma do mineral utilizada. Além disso, observou-se também que produtos estocados em embalagens de polipropileno apresentaram melhor estabilidade, quando comparado ao acondicionamento em caixas de papel. A adição de ferro às farinhas catalisou, portanto, a oxidação de lipídeos e o desenvolvimento de rancidez.

Para os alimentos elaborados com as farinhas fortificadas, utilizadas como ingredientes, não foram encontrados dados a respeito da oxidação de lipídeos, que pode ser estimulada pela presença de ferro adicionado às farinhas. Vale destacar que alguns desses alimentos apresentam prazo de validade de um ano.

De acordo com a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) nº 12, de 24 de julho de 1978 (ANVISA), os biscoitos podem apresentar teor de umidade de até 14% e o valor de acidez deve ser de no máximo 2,0 mL de solução normal de NaOH por 100 g de amostra.

7. Degradação de lipídeos em alimentos

A degradação de lipídeos pode ocorrer por várias vias em função do meio e dos agentes catalisadores. As duas alterações químicas de maior importância são a oxidação e a hidrólise lipídica (Silva et al, 1999; Araújo, 2005).

A degradação oxidativa é a principal responsável por promover alterações nos alimentos durante o processamento, distribuição e armazenamento. A oxidação de lipídeos é responsável por causar alterações nos alimentos, influenciando sua qualidade (rancidez oxidativa). A qualidade nutricional pode ser diminuída pela perda de vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, enquanto vários compostos de degradação, associados à oxidação de lipídeos, podem ser capazes de reagir com biomoléculas como proteínas, diminuindo sua absorção (Araújo, 2005).

Há evidências que a ocorrência da oxidação lipídica, no organismo, pode causar inflamações e influenciar doenças como artrite, arterosclerose e câncer. (Bianchini-Pontuschka e Penteado, 2003).

O processo da oxidação lipídica pode ser iniciado por uma etapa que é denominada de período de indução. A etapa seguinte é a propagação, onde o índice de peróxidos cresce até atingir um máximo, e a velocidade de decomposição dos peróxidos se iguala à sua velocidade de formação. Finalmente, a etapa de terminação, onde a decomposição dos peróxidos prevalece, ocorrendo então, a polimerização das moléculas. Os produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (Ferrari, 1998; Fernández *et al.*, 1997; Araújo, 2005). A oxidação lipídica é considerada um fator limitante na qualidade do alimento, podendo ser acelerada pela presença de metais de transição, como o ferro (Nawar, 1996; Bobbio e Bobbio, 1992).

O ferro por possuir dois ou mais estado de valência e um potencial de oxidação-redução alto é considerado um efetivo pró-oxidante (Nawar, 1996; Bobbio e Bobbio, 1992). Se presente no alimento, mesmo que em pequenas concentrações pode diminuir o período de indução e aumentar a taxa de oxidação

(Nawar, 1996). O modo de ação mais provável desses íons é através de sua interação com hidroperóxidos, dando origem a novos radicais ou atuando na formação de oxigênio singlete que ataca diretamente a dupla ligação (Nawar, 1996; Bobbio e Bobbio, 1992; Fraga e Oteiza, 2002).

A rancidez hidrolítica pode ocorrer por catálise enzimática, por ação das lipoxigenases, ou pela combinação de calor e umidade promovendo a liberação de ácidos graxos. Estes ácidos podem contribuir para a formação de sabor e odor estranho no alimento, influenciando sua qualidade. O processo de catálise enzimática ocorre com maior especificidade em termos de substrato e de produtos finais diferentemente do processo de autooxidação de lipídeos (Silva et al, 1999; Araújo, 2005).

8. Métodos para a determinação de ferro

As determinações de ferro podem ser executadas empregando-se a Espectrofotometria na região do visível ou a Espectrometria Atômica. No primeiro caso, é utilizada a reação de oxidação da 1,10-fenantrolina pelo Fe^{2+} e as determinações são efetuadas em um comprimento de onda de 512 nm (Mortati et al, 1982). As determinações espectrofotométricas exigem a utilização de amostras, preferencialmente, na forma líquida e um controle rigoroso de alguns parâmetros analíticos, tais como o pH da amostra e do meio reacional e a presença de interferentes.

Dentre as principais técnicas e métodos para determinação de ferro em alimentos destacam-se a FAAS e a Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES). O método utilizando ICP OES determina elementos traço simultaneamente, incluindo metais, em solução, (Fraige et al., 2007). No caso da FAAS, as amostras na forma líquida, são introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar e acetileno com temperatura de aproximadamente 2000°C. Desta forma, os átomos de ferro são atomizados e as leituras são efetuadas com o auxílio de uma lâmpada de cátodo oco que produz uma radiação específica para o ferro (Skoog, 1998).

O uso de ambas as técnicas está condicionada a um preparo prévio de amostras conhecido como processo de mineralização (Kingston et al., 1988). Nesse processo as amostras sólidas sofrem um ataque de ácidos (nítrico, clorídrico ou sulfúrico), e em alguns casos, pode ser utilizado o peróxido de hidrogênio. As amostras sólidas, na presença de ácidos, são aquecidas e inicia-se uma decomposição da matéria orgânica com liberação dos metais (entre eles o ferro) para o meio líquido. A velocidade da decomposição da matéria orgânica depende da matriz e da quantidade de amostra.

Os parâmetros avaliados para validar o método analítico utilizando a técnica FAAS para análise de ferro e outros metais em alimentos, segundo INMETRO (2010) são: precisão, seletividade, recuperação, robustez, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Jalbani et al (2010) analisou cobre, ferro e zinco em 10 amostras de sucos comerciais utilizando FAAS e os parâmetros validados foram reprodutibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e recuperação utilizando adição de 3 níveis de padrão. Doner e Ege (2004) analisaram ferro e zinco por FAAS em amostras de biscoitos e os valores encontrados foram comparados com a metodologia oficial AOAC utilizada para método espectrofotométrico, a recuperação foi realizada em 2 níveis de concentração. Saracoglu et al (2007) determinou ferro e elementos traços por FAAS em alimentos infantis na Turquia e os parâmetros validados foram limite de detecção, limite de quantificação, precisão e usou material de referência certificado para exatidão e recuperação. Iwegbue (2012) analisou metais em biscoitos consumidos na Nigéria e os parâmetros validados foram recuperação, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

9. Referências Bibliográficas

ABIMA – Associação Brasileira de Indústrias de Massas Alimentícias. **2009**. Disponível em: http://www.abima.com.br/est_mnacional.html. Consulta em agosto de 2009.

ANDANG'O, P.E.A, OSENDARP, S.J.M., WEST RACE, MWANIKI, D.L., WOLF, C.A., KRAAIJENHAGEN R., et al. Efficacy of iron-fortified whole maize flour on iron status of schoolchildren in Kenya: a randomized controlled trial. *Lancet*. 369(9575), 1799-1806, **2007**.

AKHTAR, S., ANJUM, F.M., REHMAN, S., SHEIKH, M.A. Effect of mineral fortification on rheological properties of whole wheat flour. *Journal of Texture Studies* 40 51- 65, **2009**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA 12, **1978**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídeos em alimentos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 2 - 66, **2005**.

ASSUNÇÃO, M.C.F., SANTO, I.S., BARROS, A.J.D., GIGANTE, D.P., VICTORA, C.G. Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas - RS, *Revista Saúde Pública*, v.41 (4), **2007**.

AUST SD, MILLER DM. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. In Probst GS, Vodick MJ, Dorato MA (eds): *New horizons in molecular toxicology: a symposium*. Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology ; 29-34, **1991**.

BAGNI, UV, BAIÃO MR, SANTOS MMAS, LUIZ RR, VEIGA GV. Efeito da fortificação semanal do arroz com ferro quelato sobre a frequência de anemia e concentração de hemoglobina em crianças de creches municipais do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 25(2), 291-302, **2009**.

BARBOSA, L.F., MEDEIROS M. H.G. OHARA, A. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Química Nova*, vol. 29 (6):1352-1360. **2006**.

BARBOSA, T.N.N., Avaliação do impacto do pão fortificado com sulfato ferroso microencapsulado sobre os níveis de hemoglobina em pré-escolares do município

de São Paulo. São Paulo; 2007. Doutorado [Tese em Pediatria]. Universidade Federal de São Paulo.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. DE V. C.. Vitamina E IN: PENTEADO, M. DE V. C. P. Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos – Barueri, SP: Manole, p. 121-164, **2003**.

BIANCHI M. L. P., ANTUNES, M. L. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, Revista de Nutrição., 12(2): 123-130, **1999**.

BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.19, p.53-59, **2008**.

BOEN, T.R., SOEIRO, B.T., PEREIRA-FILHO, E.R., LIMA-PALLONE, J.A. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43 (4): p.589 - 596, **2007**.

BORG, D.C., SCHAICH, K.M. Iron and iron-derived radicals. In Halliwell B (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; p.27-29, **1987**.

BOBBIO, P. A. e BOBBIO, F. O., Química do Processamento de Alimentos, 2o ed. São Paulo, Varela, **1992**.

BRASIL, 2010. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2010**.

CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de alimentos enriquecidos. Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5-8, **1996**.

CHEN J, ZHAO X, ZHANG X, YIN S, PIAO J, HUO J, et al. Studies on the effectiveness of NaFeEDTA-fortified soy sauce in controlling iron deficiency: a population based intervention trial. Food Nutr Bull. 26(2):177-186, **2005**.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole, v. 1. 878 p. **2005**.

DE PAULA, R.A ; FISBERG, M., The use of sugar fortified with iron trisglycinate chelate in the prevention of iron deficiency anaemia in preschool children. Arch Latinoam Nutr 51 (1 suppl. 1): 54-59, **2001**.

DONER, G., EGE, A., Evaluation of digestion procedures for the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 520, p. 217 – 222, **2004**.

DRUZIAN, J.I., CARVALHO, R.D.S., SILVA, L.T., SILVA, J.R., SOUZA, C.O., GALDINO, F.S.S., RIBEIRO, M.S. Teores de ácido fólico e ferro em flocos de milho enriquecidos comercializados em Salvador/BA. XLVI Congresso Brasileiro de Química, **2006**.

EI-DASH, A.A., CAMARGO, C.O., DIAZ, N.M. Fundamentos da tecnologia de panificação. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da indústria, comércio, ciência e tecnologia. p.349, **1982**.

FAIRBANKS VG, BEUTLER E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams-Hematology*. 6th ed. New York: Mcgraw-Hill; 295-304, 2004.

FERNÁNDEZ, J, PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, v. 59, n. 3, p. 345-353, **1997**.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista de Nutrição de Campinas*, v. 11, n. 1, p. 3-14, **1998**.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, v. 180, p. 23-32, **2002**.

FRAIGE, K., CRESPILO, F.N. E REZENDE, M.O.O. Determinação de zinco em solo utilizando colorimetria. *Química Nova*. v 30 (3), p. 588 - 591, **2007**.

GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. *Trends Food Science & Technology* vol 11, 403 - 409, **2000**.

HERTRAMPF, E., OLIVARES, M., PIZARRO, F., WALTER, T., CAYAZZO, M., HERESI, G. et al, Haemoglobin fortified cereal: a source of available iron in breast-fed infants. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44: 793-798, 1990.

HERTRAMPF, E., OLIVARES, M., WALTER, T., PIZARRO, F., HERESI, G., LAGUNO, S. et al. Anemia ferropriva en el lactante: erradicación con leche fortificada con hierro. *Rev. Med. Chile*, 118:1330-1337, 1990.

HUMA, N., REHMAN, S.U., AWAN, J.A., MURTAZA, M.A., ARSHAD, M.U. Effect of packaging material on the quality of iron-fortified wholemeal flour during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, v 31, 659 - 670, **2007**.

HURRELL, R.F. Preventing iron deficiency through food fortification. Nutrition Review, v. 55, p. 210 - 222, **1997**.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **2009**. População. Indicadores sociais. www.ibge.gov.br. Consulta em julho de 2012.

IWEGBUE, C.M.A., Metal contents in some brands of biscuits consumed in Southern Nigeria. American Journal of Food Technology. V. 7(3): p. 160 – 167, **2012**.

JALBANI, N., AHMED, F., GULKAZI, m dia T., RASHID, U., MUNSHI, A.B., KANDHRO, A., Determination of essential elements (Cu, Fe and Zn) in juices of commercially available in Pakistan. Food and Chemical Toxicology. v. 48, p. 2737 – 2740, **2010**.

KINGSTON H.M.; JASSIE L.B. Introduction to microwave sample preparation – Theory and practice. American Chemical Society, **1988**.

LAYRISSE, M., CHAVES, J.F., MENDEZ-CASTELLANO, H., BOSCH, V., TROPPER, E., BASTARDO, B. , GONZALEZ. E. Early response to the effect of iron fortification in the Venezuelan population et al. The American Journal Clinical Nutrition, 64: 903-907. **1996**

LI, Y., DIOSADY, L.L., JANKOWSKI, S., Effect of iron compounds on the storage stability of multiple-fortified ULtra Rice, International Journal of Food Science and Technology, 43: 423-429. **2008**

MAHAN, L. K.; ARLIN, M. T. KRAUSE. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 8. ed. São Paulo: Roca, 2002. 957 p.

MENDES, F. Q. ; GOMES, J.C. ; BARBOSA, T. S. ; SARTORI, M. A. ; OLIVEIRA, M. G. A. Formulação de leite em pó enriquecido com ferro. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 26, p. 93 - 100, **2008**.

MIGLIORANZA, L.H.S., MATSUO, T., CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., DICH, J.B., CYRINO, E.S., OLIVEIRA, I.B.N., MARTINS, M.S., POLEZER, B.S., ICHI, I. Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina Parana Brazil, Nutrition, v. 19: 419-421, **2003**.

MORTATTI, J. ; KRUG, F. J. ; PESSENDA, L. C. R. ; ZAGATTO ; JORGENSEN, S. S. . Determination of iron in natural waters and plant material with 1,10 phenanthroline by flow injection analysis. Analyst (London), CAMBRIDGE, INGLATERRA, v. 107, p. 659-663, **1982**.

NAWAR, W. W. Lipids. IN: FENNEMA O. R. Food Chemistry. 3^a ed. Series Food Science and Technology; v. 76, p. 225-320, **1996**.

NESTEL P, NALUBOLA R, SIVAKANESHAN R, WICKRAMASINGHE AR, ATUKORALA S, WICKRAMANNAYAKE T, et al. The use of iron-fortified wheat flour to reduce anemia among the state population in Sri Lanka. Int J Vitam Nutr Res ; 74:35-51. **2004**.

OLIVARES M, HERTRAMPF E, PIZARRO F, WALTER T, CAYAZZO M, LLAGUNO S, et al. Hemoglobin fortified biscuits: bioavailability and its effect on iron nutriture in school children. Arch Latinoam Nutr; v. 40, p. 209-212, 1990.

PESSOA, M.C., Eficácia do consumo de arroz fortificado com ferro no tratamento de crianças com anemia carencial Belo Horizonte. Doutorado [Tese] - Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. European Journal of Cancer Prevention, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, **1998**.

REHMAN, S.U.; ANJUM, S.A. and ANJUM, F.M. Storage stability of ferrous iron in whole wheat flour naan production. Journal of Food Processing and Preservation v. 30, p. 323–334, **2006**.

SARACOGLU, S., SAYGI, K.O., ULUOZLU, O.D., TUZEN, M., SOYLAK, M., Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. Food Chemistry, v. 105, p. 280 – 285, **2007**.

SARI, M., BLOEM, M.W., DE PEE, S., SCHULTINK, W.J., SASTROAMIDJOJO, S. Effect of iron-fortified candies on the iron status of children aged 4–6 y in East Jakarta, Indonesia. The American Journal Clinical Nutrition., 73: 1034-1039. **2001**

SILVA, F.A.M., BORGES, M.F.M., FERREIRA, M.A., Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. Química Nova. v.22(1), p. 94-103, 1999.

SIMABESP, Sindicato das Indústrias de Massas Alimentícias e Biscoitos do Estado de São Paulo, www.simabesp.org.br/site/mercado_biscoitos_simabesp.asp, Consulta em 22/03/2011

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NEIMAN, T. A. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publishing, 849p. **1998**.

TORRES, M.A.A., LOBO, N.F., SATO, K., SOUZA QUERIOS S. Fortificação do leite fluído na prevenção e tratamento da anemia carencial em crianças menores de 4 anos. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.30, n.4, p.350-357, **1996**

TORRES, M. A. A.; SATO, K.; LOBO, N. F.; QUEIROZ, S. S. Efeito do uso de leite fortificado com ferro e vitamina C sobre os níveis de hemoglobina e condição nutricional de crianças menores de dois anos. Rev. Saúde Pública, v. 29, n. 4, p. 301-307, **1995**.

TUMA RB, YUYAMA LKO, AGUIAR JPL, MARQUES HO. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato no nível de hemoglobina de pré-escolares. Revista de Nutrição; 16:29-39. **2003**.

VAN STUIJVENBERG M.E, SMUTS C.M, WOLMARANS P., LOMBARD C.J, DHANSAY M.A. The efficacy of ferrous bisglycinate and electrolytic iron as fortificants in bread in iron deficient school children. British Journal of Nutrition; 95: 532-538. **2006**.

VITERI, F.E., ALVAREZ, E., BATRES, R., TORÚN, B., PINEDA, O., MEJÍA, L.A., SYLVI, J. Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminetetraacetate (FeNaEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. American Journal Clinical Nutrition, 61: 1153-1163. **1995**

WALTER, T., HERTRAMPF, E., PIZARRO, F., OLIVARES, M., LLAGUNO, S., LETELIER, A., VEGA, V., SHEKEL, A. Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile, American Journal Clinical Nutrition., 57:190-194. **1993**

WALTER T, PINO P, PIZARRO F, LOZOFF B. Prevention of iron-deficiency anemia: comparison of high- and low-iron formulas in term healthy infants after six months of life. Journal of Pediatrics.; 132:635– 640. **1998**

WIJAYANTI N, KATZ N, IMMENSCHUH. Biology of heme in health and disease. Curr Med Chem.11(8), 981-6, **2004**.

WORWOOD M., EVANS W.D., VILLIS R.J. & BURNETT A.K., Iron absorption from a natural mineral water. Clinical Laboratory Haematology. v. 18, p. 23 – 27, **1996**.

CAPÍTULO 2

Método analítico para determinação de ferro por FAAS: validação e aplicação em amostras de biscoitos

Ana Paula Rebellato, ¹ Juliana Azevedo Lima Pallone

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Resumo

A fortificação de alimentos com ferro se tornou uma prática comum e bem aceita em todo o mundo. O ferro atua diretamente na prevenção da anemia ferropriva, um dos principais problemas de saúde pública mundial, decorrentes da deficiência deste mineral. Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução nº 344 instituiu a obrigatoriedade do enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. Geralmente, essas farinhas são utilizadas na fabricação de massas, pães, biscoitos e bolos. Para se garantir a ingestão de ferro, utilizado como veículo de fortificação, tornam-se necessários estudos para verificar o teor do mineral nos alimentos disponíveis para o consumo. O objetivo deste trabalho foi adequar e validar uma metodologia para a determinação de ferro em biscoitos elaborados com de farinha de trigo fortificada, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O método foi validado para os parâmetros precisão, seletividade, recuperação, exatidão, sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e se mostrou adequado. Os valores obtidos para precisão foram menores que 6% (CV), a recuperação para os tipos de biscoitos variaram de 105 a 109%, os limites de detecção e quantificação foram 0,4 e 1,3 mg 100 g⁻¹, respectivamente. A faixa linear e a sensibilidade mostraram-se adequadas. Foram analisadas quatro marcas de quatro tipos diferentes de biscoitos cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado, cada uma em três diferentes lotes, totalizando 41 amostras. Os resultados obtidos em teor de ferro para os tipos de biscoitos cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado foram: 5,0 – 8,6; 5,3 – 7,8; 2,5 – 6,8; 4,0 – 5,7 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Após a realização da análise estatística dos dados com aplicação da ANOVA e do Teste de Tukey (p≤0,05), verificou-se que existe diferença significativa para o teor de ferro obtido entre lotes de mesma marca e entre marcas do mesmo tipo de biscoito.

Palavras-chave: biscoito; ferro; absorção atômica com chama; validação.

Abstract

Food fortification with iron has become a common and well accepted practice throughout the world. Iron acts directly preventing anemia, one of the main world public health problems, resulting from the deficiency of this mineral. In 2002, ANVISA (Brazilian Regulatory Institute) established the obligation of enriching wheat and corn flours with folic acid and iron, by the resolution no. 344. These flours are basically used to produce bread, dough, cookies, biscuits and cakes. Further studies have been necessary to guarantee iron intake and to evaluate the mineral content in food matrices. This work redesigned and validated one methodology for iron determination in biscuits produced with fortified wheat flour, by using Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). The method was validated for the parameters precision, selectivity, recovery, accuracy, linearity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) and was shown to be adequate. Precision values were lower than 6% (CV), with recovery values for each type of biscuits studied varying from 105 to 109%. The limits of detection and quantification were 0.4 and 1.3 mg 100 g⁻¹, respectively. Linearity and sensibility were shown to be adequate. Four brands of four different types of biscuits were analyzed, each one in three different batches, in a total of 41 samples. The iron content obtained for cream cracker, salt and water, cornstarch cookies (maizena) and butter cookies were: 5.0 – 8.6, 5.3 – 7.8, 2.5 – 6.8, 4.0 – 5.7 mg 100 g⁻¹, respectively. There were significant difference of the iron content among batches of the same brand and among brands of the same type of biscuits, detected by statistical analysis of the obtained data using ANOVA and Tukey test (p<0,005).

Keywords: biscuits; iron; flame atomic absorption spectrometry (FAAS); validation.

1. Introdução

Os biscoitos são aceitos e consumidos por pessoas de qualquer idade. São obtidos pela mistura de farinha, amido e ou fécula com outros ingredientes submetidos a processos de amassamento, fermentados ou não, podendo apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos. Sua longa vida de prateleira permite que sejam produzidos em grande quantidade e largamente distribuídos. A farinha de trigo constitui o principal ingrediente das formulações de biscoitos fornecendo a matriz em torno da qual os demais ingredientes são misturados para formar a massa (Gutkoski et al, 2007).

Em 2009 foram produzidos no Brasil 1.206 milhões de toneladas de biscoito, o que representou a segunda posição na escala mundial de produção. Entre os anos de 2007 e 2009 o consumo per capita anual de biscoitos subiu de 6,0 para 6,3 kg. De acordo com a Resolução CNNPA 12, de 24 de julho de 1978 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os biscoitos podem ser classificados de acordo com o ingrediente que o caracteriza ou por nomes consagrados pelo uso, exemplo “bolacha de coco”, “biscoito de polvilho”.

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução nº 344 de 13 de dezembro de 2002 determinou o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico ($150 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e ferro ($4,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia, associadas a deficiência desses nutrientes, respectivamente, já que essas farinhas são largamente consumidas pela população brasileira (ANVISA, 2002).

A introdução da obrigatoriedade da fortificação de farinhas com esse mineral, combinado ao consumo de alimentos ricos em promotores para sua absorção, como carnes e frutas cítricas, ajudaram os países desenvolvidos a reduzirem a deficiência de ferro e conseqüentemente a anemia de forma significativa (Hurrell e Jacobs, 1996). O regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais publicado pela

ANVISA (BRASIL, 2005) indica o consumo de 14 mg de ferro para adultos, 9 mg para crianças e 27 mg para gestantes.

A fortificação de alimentos com ferro é a estratégia indicada pelas instituições que atuam na área de saúde como a forma mais eficiente para o combate à anemia ferropriva. Segundo World Health Organization (WHO, 1993 – 2005) 25% da população apresenta deficiência em ferro. O risco de deficiências é maior quando os requerimentos de ferro são maiores como na primeira infância, adolescência e durante a gestação (Lynch, 2005).

Soeiro e colaboradores (2010) em estudo realizado observaram que as concentrações de ferro encontradas nas farinhas de trigo brasileiras estudadas apresentaram valores superiores aqueles indicados pela Resolução nº 344. É importante destacar que as farinhas de trigo enriquecidas serão utilizadas como ingrediente para o preparo de diversos alimentos, incluindo pães, massas, bolos, biscoitos, entre outros.

Dentre as principais técnicas e métodos para determinação de ferro em alimentos destacam-se a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES). O método utilizando ICP OES determina elementos traço, incluindo metais, em solução (Fraige et al., 2007). No caso da FAAS, as amostras na forma líquida, são introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar e acetileno com temperatura de aproximadamente 2000 °C. Desta forma, os átomos de ferro são atomizados e as leituras são efetuadas com o auxílio de uma lâmpada de cátodo oco que produz uma radiação específica para o ferro (Skoog, 1998).

O uso da FAAS está condicionado a um preparo prévio de amostras conhecido como processo de mineralização (Kingston et al., 1988). Nesse processo as amostras sólidas sofrem um ataque ácido (nítrico, clorídrico ou sulfúrico), o peróxido de hidrogênio pode ser usado em conjunto com o ácido. As amostras sólidas, na presença de ácidos, são aquecidas e ocorre a decomposição da matéria orgânica com liberação dos metais para o meio líquido (Doner & Ege, 2004; Saracoglu, et al, 2007; Jalbani, et al, 2010).

Os parâmetros avaliados para validar o método analítico utilizando a técnica FAAS para análise de ferro e outros metais em alimentos, segundo INMETRO (2010) são: precisão, seletividade, recuperação, robustez, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Jalbani et al (2010) analisou cobre, ferro e zinco em sucos comerciais por FAAS e os parâmetros validados foram reprodutibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação. Doner e Ege (2004) determinaram ferro e zinco por FAAS em amostras de biscoitos e os valores foram comparados com metodologia oficial AOAC utilizada para método espectrofotométrico. Saracoglu et al (2007) determinou ferro e elementos traços por FAAS em alimentos infantis na Turquia e os parâmetros validados foram limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e recuperação. Iwegbue (2012) determinaram metais em biscoitos consumidos na Nigéria e os parâmetros validados foram recuperação, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

Devido à falta de informações sobre alimentos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro os objetivos deste trabalho foram: adequar, validar e aplicar uma metodologia para a determinação de ferro em biscoitos, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e Soluções

Foram utilizados ácido nítrico (Synth) e peróxido de hidrogênio (Synth), de grau analítico.

Os padrões utilizados foram: solução padrão de ferro 1000 mg g⁻¹, (PAFE 1000-0125), rastreado ao SEM 136e, NIST-USA (Quemis) e material de referência certificado (MRC) de farinha de trigo, 1567a (NIST).

No preparo de soluções utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q, modelo Plus (Millipore, EUA). Papéis de filtro qualitativo de 9 cm de diâmetro e gramatura (80 gr) foram usados para filtrar as soluções ácidas digeridas.

2.2 Equipamentos e vidrarias

As análises espectrométricas foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS), (modelo AAnalyst 200), com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e lâmpada de cátodo oco (Perkin Elmer) para determinação de ferro (248,3 nm),.

As amostras foram trituradas em moinho (modelo A11 - Ika) e pesadas em balança analítica (modelo AP210-0 - Ohaus,). Um bloco digestor (modelo M242 - Quimis) foi utilizado para a mineralização das amostras e um banho ultra-sônico (modelo 1510 - Branson) foi utilizado para melhorar a solubilização das amostras para a transferência do material digerido.

Pipetas automáticas de volumes variáveis: 10 a 100 µL e 100 a 1000 µL, (Labmate), foram utilizadas para o preparo da curva analítica.

Tubos de vidro com 25 cm de comprimento, 2 cm de diâmetro interno e 2 mm de espessura da parede e funis (3 cm de diâmetro e 8 cm de comprimento) foram utilizados na decomposição de compostos orgânicos para determinação de ferro. Vidrarias como: balões volumétricos, pipetas graduadas e volumétricas, frascos plásticos e de vidro, béquers, erlenmeyers foram utilizados durante o preparo das amostras.

2.3 Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente (imersão por no mínimo 6 horas) e enxaguadas com água até total eliminação de espumas, em seguida foram imersas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por, no mínimo, 12 horas. Após esse tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água purificada pelo sistema Milli-Q. A secagem ocorreu à temperatura ambiente, protegidas com papel toalha para evitar poeira e re-contaminações.

2.4 Amostras

As amostras de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas – SP. Para o desenvolvimento da validação utilizou-se amostras de biscoito tipo água e sal, cream cracker, maisena e amanteigado. Para as análises do teor de ferro, foram avaliadas quatro marcas de quatro tipos diferentes de biscoitos cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado, cada um em três diferentes lotes, totalizando 41 amostras. Cada lote foi formado por seis embalagens de biscoito, de cada embalagem foram retirados 100 g de biscoito, que foram moídos e homogeneizados para a realização das análises.

2.5 Mineralização das amostras

Pesou-se 0,60 g de cada tipo de amostra em tubos de digestão. Adicionou-se 8 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Um tubo de “branco” (sem a amostra) também foi preparado. Após isto, colocaram-se pequenos funis na entrada de cada tubo de digestão, a fim de manter refluxo dentro do tubo, e os mesmos foram levados ao bloco digestor para início do aquecimento. Os tubos foram aquecidos por 2 horas a 110°C para a digestão completa da amostra. Após este processo, os tubos foram retirados do bloco e aguardou-se o resfriamento. Adicionou-se 5 mL de água aos tubos de digestão e em seguida foram submetidos ao banho de ultra-som por 5 minutos. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água. As amostras

foram filtradas em papel de filtro e armazenadas em frasco de plástico para determinação do teor de ferro. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.6 Determinação de ferro por FAAS

As amostras após o processo de digestão foram introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar ($2,5 \text{ L.h}^{-1}$) e acetileno (10 L.h^{-1}) com temperatura de aproximadamente 2000°C , para a determinação do teor de ferro nas amostras analisadas.

2.7 Validação dos métodos analíticos

A validação dos métodos analíticos foi baseada principalmente nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), conforme a “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos” (BRASIL, 2010) e da Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2003).

Para a determinação do teor de ferro por FAAS o tipo de ensaio é classificado como análise de elementos menores ou traços. Assim, os parâmetros de validação recomendados pelo INMETRO (BRASIL, 2010) são: precisão, seletividade, recuperação, sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A etapa inicial do processo de validação consistiu na avaliação da sensibilidade e linearidade por padronização externa, e da precisão e exatidão do método proposto utilizando material de referência certificado (farinha de trigo - NIST 1567a).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito na amostra. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática, geralmente uma equação de primeiro grau que relaciona as variáveis da forma $y = ax + b$. No caso da metodologia de determinação de ferro por FAAS, y representa

a absorvância, x equivale à concentração, b é a intersecção com o eixo y e a é a inclinação da curva analítica e representa a sensibilidade do método. Cabe ressaltar que o método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (BRASIL, 2010).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O procedimento geralmente adotado é calcular o modelo através da regressão linear, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r) (BRASIL, 2010).

Para avaliação desse parâmetro, foram construídas curvas analíticas (padronização externa), com 7 níveis de concentração, em 6 replicatas. A faixa de trabalho foi selecionada de forma que o menor nível de concentração fosse superior ao limite de quantificação instrumental e a concentração esperada na amostra situa-se dentro da faixa de trabalho. A linearidade foi avaliada através da regressão linear, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r) e a sensibilidade foi expressa como o coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2010).

A precisão foi avaliada em condições de repetitividade, através da análise de amostras de farinha de trigo e de quatro tipos de biscoitos em sete repetições independentes. A partir dos resultados, foi calculado o desvio padrão amostral (s) e a repetitividade foi expressa como coeficiente de variação (CV).

Dessa forma, as amostras de biscoitos foram analisadas em sete repetições independentes, em condições de repetitividade. A partir dos resultados, foi calculado o desvio padrão amostral (s) e a repetitividade foi expressa como coeficiente de variação (CV). Os valores de CV obtidos foram comparados com a equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$, onde C é a fração de massa expressa como exponencial de 10) que estabelece para ensaios de repetitividade intra-laboratorial que o CV deve situar-se entre 1/2 e 2/3 do valor calculado pela equação, o que é justificado uma vez que esta equação expressa a dependência entre a variância e

a concentração do analito, assumindo resultados obtidos por métodos diferentes em ensaios inter-laboratórios (BRASIL, 2010).

Para avaliação da precisão intermediária as análises foram realizadas no mesmo laboratório (mesmo equipamento, mesmo analista), em dias diferentes. Procedeu-se as determinações em sete repetições independentes, em três dias diferentes. A precisão intermediária foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) de fator único, adotando-se 95% de nível de confiança.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência / recuperação de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida pela equação 1:

Equação 1

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

Portanto, esse parâmetro foi avaliado pela determinação de ferro em amostra de material de referencia certificado (farinha de trigo), em sete replicatas, sendo que o valor medido foi comparado com o valor certificado pelo NIST. Outra forma de se avaliar a recuperação é a realização de testes de recuperação de padrões de ferro adicionados aos biscoitos. A concentração de ferro presente nas amostras sem adição de padrão e cada uma das amostras com padrão adicionado foram analisadas e as quantidades medidas foram relacionadas com a quantidade adicionada, através da equação 2, indicada pelo INMETRO (BRASIL, 2010).

Equação 2

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$$

Sendo:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

O limite de detecção (LD) é definido como sendo a menor quantidade ou concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD foi estimado através do método baseado em parâmetros da curva analítica, descrito por Ribani et al. (2004), onde utilizou-se solução padrão diluída de ferro até uma faixa de concentração próxima ao limite de detecção do equipamento. O valor foi calculado através da equação 3:

$$LD = 3,3 \times s/S$$

Equação 3

s= estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica

S= coeficiente angular da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) é definido segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ foi calculado, também de acordo com Ribani et al (2004) utilizando-se a mesma curva analítica usada para determinar o LD de acordo com a equação 4:

$$LQ = 10 \times s/S$$

Equação 4

s= estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica

S= coeficiente angular da curva analítica.

2.8 Análise de carbono residual

Uma amostra de cada tipo de biscoito após sofrer o processo de mineralização conforme item 2.5 foi enviada ao Centro de Tecnologia de Embalagens (CETEA), no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas,

em estudo de colaboração para a análise de carbono residual. As determinações foram realizadas por ICP OES (Perkin Elmer), (modelo OPTIMA 2000 DV), configuração axial.

2.9 Análise estatística

As médias obtidas para cada lote de uma mesma marca foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança, utilizando o software *Statistica 7,0* (Statsoft, USA).

3. Resultados e Discussões

3.1 Validação de método para análise de ferro em biscoitos

3.1.1 Avaliações da linearidade e sensibilidade através de padronização externa

Foram construídas seis curvas de calibração para a obtenção da faixa linear de trabalho que correlacionam a absorbância medida com a concentração de ferro presente na amostra. As curvas consistiram de sete pontos, em 6 repetições independentes e as concentrações utilizadas foram 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2 e 2,6 mg L⁻¹ de ferro, conforme demonstrado na **Tabela 1** e na **Figura 1** que apresenta a curva de calibração.

Tabela 1: Valores de absorbância para cada concentração de solução padrão de ferro para a construção da curva de calibração:

Concentração (mg L ⁻¹)	Absorbância						Média	Desvio padrão	C.V (%)
	6 repetições independentes								
0,2	0,015	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,013	0,001	11,03
0,6	0,037	0,035	0,035	0,037	0,037	0,037	0,036	0,001	2,84
1,0	0,060	0,058	0,059	0,062	0,061	0,062	0,060	0,002	2,71
1,4	0,081	0,080	0,080	0,084	0,084	0,085	0,082	0,002	2,73
1,8	0,103	0,103	0,103	0,107	0,108	0,109	0,106	0,003	2,66
2,2	0,124	0,125	0,124	0,129	0,130	0,131	0,127	0,003	2,51
2,6	0,143	0,145	0,144	0,150	0,151	0,152	0,148	0,004	2,67

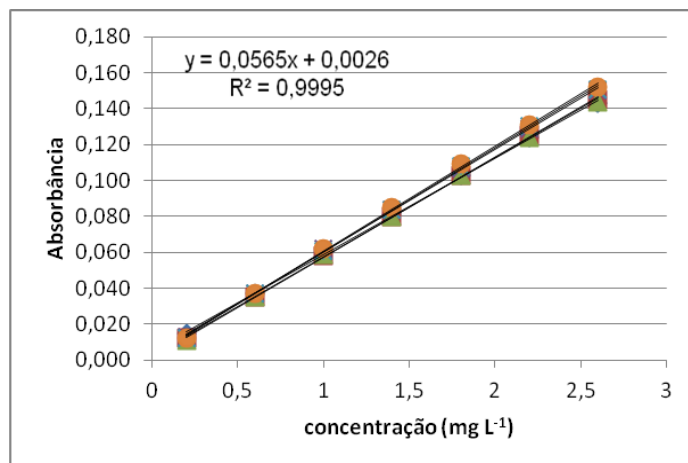


Figura 1: Curva de calibração para determinação da faixa linear de trabalho e equação para quantificação do teor ferro nas amostras de biscoito.

A porcentagem de variação explicada ($R^2 = 99,95\%$) da curva mostrou que a faixa linear escolhida para o trabalho é adequada para avaliar o teor de ferro presente nas amostras.

Visualizando a **Figura 2**, observa-se que o gráfico dos resíduos plotados segue uma distribuição normal em torno do zero, mostrando que o método está livre de tendências. De acordo com a curva analítica apresentada, observa-se correlação linear entre as variáveis, com valores de r superiores a 0,99. A linearidade foi confirmada pela distribuição dos resíduos, positivo e negativo, que indicam que não há erro sistemático e que há adequada distribuição dos pontos ao longo da curva analítica.

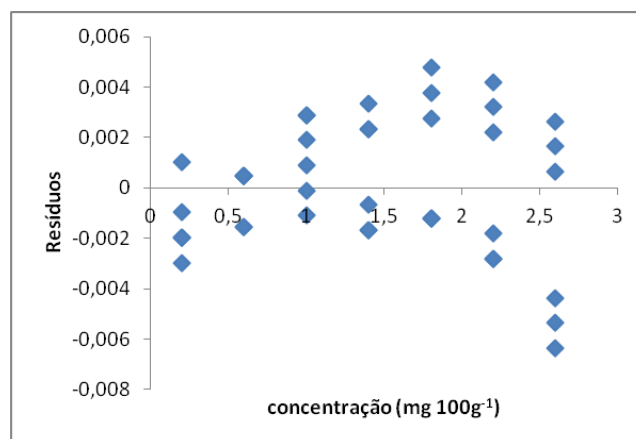


Figura 2. Gráfico dos resíduos

3.1.2 Repetitividade e recuperação utilizando MRC NIST 1567a (farinha de trigo)

Amostra de material de referência certificada (farinha de trigo sem adição de ferro) foram mineralizadas de acordo com o procedimento descrito no item 2.5, em sete repetições independentes a fim de verificar a repetitividade e a exatidão do método analítico. Os valores medidos são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Teor de ferro medido na amostra de farinha de trigo (MRC)

Repetição	Teor de ferro ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	14,4
2	14,4
3	14,3
4	14,0
5	14,3
6	14,7
7	13,4
Média	14,2
Estimativa do desvio padrão (s)	0,4
Coeficiente de variação (%)	2,9

O valor médio obtido foi $14,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e o coeficiente de variação (CV) calculado pela equação de Horwitz foi 10,7%. A recomendação do INMETRO (BRASIL, 2010) é de que em condições de repetitividade, o coeficiente de variação intralaboratorial deve situar-se entre a metade e dois terços do valor teórico calculado por intermédio da equação de Horwitz. Assim, o valor de CV calculado é inferior ao recomendado 7,1%. Esse resultado indicou que o procedimento de mineralização esta adequado para quantificação de ferro nas condições do equipamento de FAAS.

Em relação à exatidão, o valor médio encontrado, expresso com intervalo de confiança de 95% é igual a $(14,2 \pm 0,4) \mu\text{g g}^{-1}$. O valor do material certificado pelo NIST é $(14,1 \pm 0,5) \mu\text{g g}^{-1}$, portanto, o valor medido encontra-se no intervalo de confiança do valor esperado. Avaliando a exatidão com base na recuperação, obteve-se 99,3% de recuperação do ferro presente no MRC. Não há recomendações claras no guia do INMETRO (BRASIL, 2010) em relação aos

valores aceitáveis de recuperação. A ANVISA (BRASIL, 2003) recomenda que as porcentagens de recuperação devam ser próximas a 100%, portanto, o resultado obtido indicou que o procedimento de mineralização está adequado para quantificação de ferro.

A determinação do teor de carbono residual nos biscoitos mineralizados é outra maneira de verificar se o processo de preparo da amostra está adequado ou não. Os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Teor de carbono residual em amostras de biscoitos.

Tipos de biscoito	Carbono residual (%)	
	Valor médio	CV (%)
água e sal (n=3)	0,2	19,8
cream cracker (n=3)	0,2	10,5
maisena (n=3)	0,2	5,4
amanteigado (n=3)	0,2	7,0

CV (%) = coeficiente de variação

Conforme os resultados apresentados na **Tabela 3**, os valores de carbono residual para todos os tipos de biscoitos são iguais a 0,2%. Através deste parâmetro é possível afirmar que praticamente toda a matéria orgânica presente na matriz foi oxidada, ou seja, o sistema de decomposição da matriz em estudo é eficiente.

3.1.3 Precisão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de ferro em biscoito por FAAS.

A precisão da metodologia para a determinação de ferro em biscoitos foi avaliada em condições de repetitividade e de precisão intermediária pela análise de sete repetições independentes nos quatro tipos de biscoitos. O fator de variação foi a realização das análises em três dias diferentes (tempos diferentes). Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de precisão, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação para determinação de ferro em biscoitos.

Tipos de biscoito	Precisão (Média)		HORWITZ CV (%)	Recuperação (%)
	$\mu\text{g g}^{-1}$	CV (%)		
Precisão intra-dia				
água e sal (n=7)	59,8	3,8	8,6	109
cream cracker (n=7)	79,3	3,7	8,3	108
maisena (n=7)	68,3	5,3	8,5	108
amanteigado (n=7)	44,4	5,9	9,0	105
Precisão inter-dias (3 dias)				
água e sal (n=3)	59,3	6,1		
cream cracker (n=3)	76,2	4,6		
maisena (n=3)	68,0	6,7		
amanteigado (n=3)	44,9	5,1		
Limite de detecção (LD)		0,4 mg.100g ⁻¹ (0,047 mg L ⁻¹)		
Limite de quantificação (LQ)		1,3 mg 100g ⁻¹ (0,15 mg L ⁻¹)		
CV: coeficiente de variação				

Os valores médios de coeficiente de variação obtidos, conforme a **Tabela 4** para os tipos de biscoitos foram de 3,7 a 5,9%. Os valores de CV calculado pela equação de Horwitz variaram de 8,3 a 9,0%. Segundo o INMETRO (BRASIL, 2010), em condições de precisão, o coeficiente de variação intralaboratorial deve situar-se entre a metade e dois terços do valor teórico calculado por intermédio da equação de Horwitz. Os valores de CV calculados são inferiores ao recomendado por Horwitz 5,5 a 6,0%, indicando que o procedimento de mineralização está adequado para quantificação de ferro nas condições estabelecidas no equipamento de FAAS.

A avaliação da recuperação foi realizada a partir da determinação da concentração de ferro presente em cada tipo de biscoito sem adição de padrão e posteriormente foram adicionado padrão de ferro correspondente ao valor de 100% (nível alto) e as quantidades medidas foram relacionadas com a quantidade adicionada, através da equação de recuperação fornecida pelo INMETRO (2010).

Os valores de recuperação para os diferentes tipos biscoitos foram 109% (água e sal), 108% (cream cracker), 108% (maisena) e 105% (amanteigado), conforme apresentado na **Tabela 4**. A avaliação da recuperação depende do

confrontamento dos resultados obtidos com valores críticos estabelecidos como requisitos analíticos do método, os quais variam em função da concentração do analito presente na amostra. A Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), estabelece para ensaios de recuperação para uma concentração de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ uma faixa de aceitação de 80 a 115% de variação. Os resultados obtidos no ensaio de recuperação, também estão de acordo com as recomendações da IUPAC uma vez que os valores encontrados nas matrizes de biscoitos estão na faixa estabelecida pelo órgão em questão.

A precisão intermediária foi avaliada por análise de variância (ANOVA), técnica pela qual é possível de isolar e estimar as variâncias que contribuem para a variação total do experimento. Ela permite identificar quais as variâncias são relevantes e estabelece meios para estimar seus efeitos. É avaliada a variância dentro de um grupo e entre grupos. Foi utilizada a ANOVA com um fator de classificação, ou seja, análise de variância que avalia a influência de apenas um fator, neste caso, os dias diferentes. Os dados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária.

Biscoito Amanteigado					Biscoito Cream Cracker				
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Inter-dias	14,1	2	7,0	1,38	Inter-dias	48,5	2	24,3	2,13
Intra-dia	91,5	18	5,1		Intra-dia	204,8	18	11,4	
Total	105,6	20			Total	253,3	20		
Biscoito Água e Sal					Biscoito Maisena				
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Inter-dias	2,5	2	1,3	0,09	Inter-dias	18,4	2	9,2	0,50
Intra-dia	259,3	18	14,4		Intra-dia	333,2	18	18,5	
Total	261,8	20			Total	351,6	20		

SQ = soma dos quadrados; *gl* = graus de liberdade; *MQ* = média da soma dos quadrados

De acordo com a **Tabela 5**, foram obtidos os valores de F para os biscoitos tipo amanteigado, cream cracker, água e sal e maisena. O valor de F tabelado ao

nível de confiança de 95% é 3,55. Como os valores de F calculado são menores que F tabelado para os quatro tipos de biscoitos, conclui-se que o fator de variação não é significativo sobre a resposta, ou seja, a determinação do teor de ferro em diferentes dias não resultou em médias diferentes estatisticamente.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações obtidas pela curva analítica com diluições de padrão de ferro próximo ao limite de detecção do equipamento, em triplicata, de acordo com Ribani et al (2004). As curvas consistiram de sete pontos mais o branco e as concentrações utilizadas foram 0,08; 0,12; 0,16; 0,20; 0,24; 0,28 e 0,32 mg L⁻¹ de ferro, conforme demonstrado na **Figura 3**.

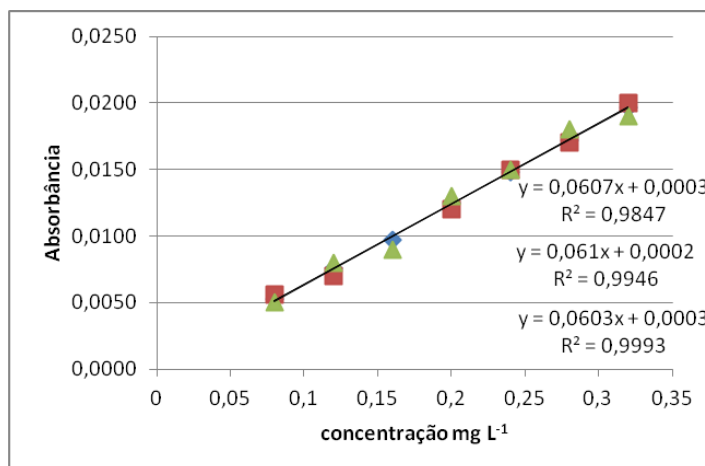


Figura 3. Curva analítica para determinação do limite de detecção e quantificação para quantificação do teor ferro em amostras de biscoito.

A porcentagem de variação explicada ($R^2 = 99,28\%$) da curva mostrou que a faixa linear escolhida para o trabalho é adequada para avaliar os limites de detecção e quantificação para a determinação do teor de ferro em amostras de biscoitos.

Visualizando a **Figura 4**, observa-se que o gráfico dos resíduos plotados segue uma distribuição normal e há valores positivos e negativos em torno do zero, mostrando que o método está livre de erro sistemático. De acordo com a curva analítica apresentada observa-se correlação linear entre as variáveis, com

valores de r superiores a 0,99. A linearidade foi confirmada pela distribuição aleatória dos pontos no gráfico de resíduos, o que indica homocedasticidade e ausência de autocorrelação.

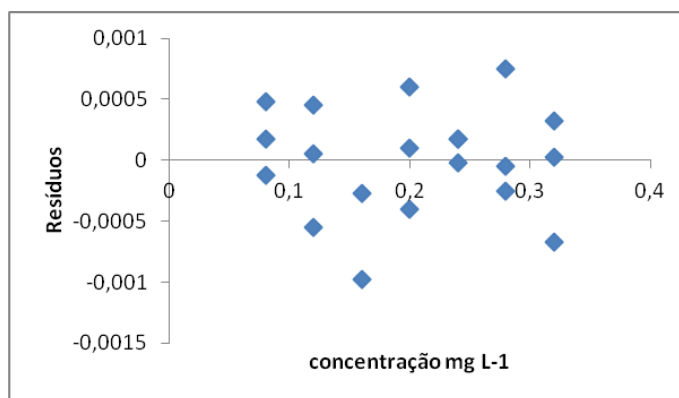


Figura 4. Gráfico dos resíduos referente ao LD e LQ.

De acordo com a **Tabela 4**, os valores de limite de detecção e quantificação encontrados foram de 0,4 mg 100g⁻¹ e 1,3 mg 100g⁻¹, respectivamente. Estes valores são estimativas de limites de detecção e quantificação, uma vez que a matriz escolhida para o desenvolvimento do trabalho (biscoitos) não são disponibilizados sem adição de ferro, ou seja, todos os biscoitos comercializados são produzidos com farinha de trigo enriquecida com ferro. Cabe ressaltar que as farinhas de trigo e milho devem conter 4,2 mg 100 g⁻¹ de ferro segundo a resolução normativa nº 344 (ANVISA) e os valores estimados que foram encontrados de LD e LQ (0,4 e 1,3 mg 100 g⁻¹) são valores inferiores ao valor pré-estabelecido para farinha (4,2 mg 100 g⁻¹). Além disso, o teor de ferro encontrado nos biscoitos também são superiores ao valor de LQ estabelecido.

3.2 Quantificação do teor de ferro em biscoito por FAAS

Após a realização da etapa de validação do método analítico para a determinação do teor de ferro em biscoito, a etapa seguinte foi a realização da determinação de ferro nas matrizes de biscoito. Para isso, as amostras após

sofrerem processo de digestão (item 2.4 e 2.5) foram introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar ($2,5 \text{ L h}^{-1}$) e acetileno (10 L h^{-1}) com temperatura de aproximadamente 2000°C e submetidas a leitura de absorbância no equipamento de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

Os valores do teor de ferro ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) encontrados nos biscoitos tipo cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Teor de ferro (expresso em mg 100 g⁻¹) em amostras de biscoitos.

Biscoito Água e Sal					Biscoito Maisena				
Marca	Lote	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)	Marca	Lote	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)
A	1	6,6 ± 0,5	^a	7,1	I	1	6,8 ± 0,3	^a	4,4
	2	6,4 ± 0,4	^a	5,8		2	5,3 ± 0,3	^a	5,1
	3	6,4 ± 0,4	^a	4,7		3	4,1 ± 0,3	^a	6,9
B	1	5,3 ± 0,4	^b	6,3	J	1	5,4 ± 0,4	^a	6,4
	2	6,9 ± 0,5	^a	5,8		2	5,2 ± 0,1	^a	2,1
	3	7,3 ± 0,3	^a	3,7		3	5,4 ± 0,3	^a	5,7
C	1	5,3 ± 0,4	^b	8,0	K	1	3,9 ± 0,2	^a	5,6
	2	5,5 ± 0,5	^{ab}	9,3		2	4,1 ± 0,4	^a	8,2
	3	6,1 ± 0,5	^a	6,7		3	4,1 ± 0,2	^a	5,6
D	1	6,7 ± 0,7	^b	8,3	L	1	2,6 ± 0,3	^a	11,3
	2	7,8 ± 0,7	^a	6,7		2	2,5 ± 0,4	^a	15,1
	3	7,1 ± 0,5	^{ab}	7,2		3	2,5 ± 0,3	^a	12,3
Biscoito Cream Cracker					Biscoito Amanteigado				
Marca	Lote	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)	Marca	Lote	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)
E	1	7,3 ± 0,4	^b	5,2	M	1	5,7 ± 0,2	^a	4,1
	2	7,5 ± 0,5	^b	6,7		2	3,7 ± 0,3	^b	6,7
	3	8,6 ± 0,8	^a	8,9					
F	1	5,4 ± 0,3	^b	5,5	N	1	4,1 ± 0,4	^a	8,9
	2	5,7 ± 0,7	^b	11,0		2	4,0 ± 0,3	^a	6,6
	3	6,7 ± 0,2	^a	2,3		3	4,3 ± 0,3	^a	6,2
G	1	6,3 ± 0,2	^b	3,6					
	2	6,6 ± 0,3	^{ab}	3,8					
	3	6,7 ± 0,4	^a	5,2					
H	1	5,0 ± 0,2	^b	4,6					
	2	5,5 ± 0,1	^a	2,4					
	3	5,5 ± 0,2	^a	3,4					

* Valores expressos como média (n=6) ± intervalo de confiança ($t_{(n-1)} \cdot s/\sqrt{n}$), teste t (95%) e o coeficiente de variação (CV %). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para os lotes de uma mesma marca, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Na **Tabela 6**, pode-se observar que, entre os lotes de uma mesma marca, existem diferenças significativas para o teor de ferro. Isto demonstra a dificuldade de se produzir lotes homogêneos. Para os biscoitos água e sal, cream cracker e

amanteigado este fato pode ser justificado pela falta de homogeneidade no processo de adição de ferro às farinhas. Boen et al (2007 e 2008) avaliaram o teor de ferro em diferentes amostras de farinhas produzidas no Brasil, utilizando a técnica de FAAS e encontraram uma variação de 4,1 a 10,0 mg 100 g⁻¹ em 30 amostras e de 2,5 a 10,0 mg 100 g⁻¹ em 70 amostras de farinhas de trigo e milho. Soeiro et al (2010) observaram que a concentração de ferro encontrado nas farinhas de trigo brasileiras estudadas apresentaram variação de 5,1 a 9,4 mg 100 g⁻¹, valores estes superiores aqueles indicados pela Resolução n° 344 (4,2 mg 100 g⁻¹).

Já os biscoitos tipo maisena apresentaram lotes contendo quantidade de ferro semelhante para as quatro marcas distintas. Isto pode ser justificado pela diferença de processo de fabricação entre os biscoitos salgados e os semidoces duros. A proporção de ingredientes é outro fator que pode alterar a composição final dos biscoitos.

Para poder efetuar a comparação entre as diferentes marcas, optou-se por calcular a média dos valores dos três lotes de cada marca, resultando em apenas um valor para cada uma delas. Assim foi possível comparar as marcas entre si através da ANOVA e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança. A **Tabela 7** mostra que existe diferença significativa entre as marcas, para a maioria dos biscoitos analisados. Somente o biscoito tipo amanteigado apresentou o mesmo teor de ferro para as duas marcas analisadas. Este fato era esperado, uma vez que houve diferença entre os lotes de uma mesma marca. Uma possível explicação para esse comportamento dos biscoitos amanteigados é a análise de um menor número de amostras. Não foi possível a aquisição de mais marcas com lotes diferentes, esta amostra foi composta apenas por duas marcas.

Tabela 7. Teor médio de ferro (expresso em mg 100 g⁻¹) para as diferentes marcas de biscoitos.

Biscoito Água e Sal				Biscoito Maisena			
Marca	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)	Marca	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)
A	6,5 ± 0,4	^b	5,9	I	5,4 ± 0,3	^a	5,5
B	6,5 ± 0,4	^b	5,2	J	5,3 ± 0,3	^a	4,7
C	5,6 ± 0,5	^c	8,0	K	4,1 ± 0,3	^b	6,5
D	7,2 ± 0,6	^a	7,4	L	2,5 ± 0,3	^c	12,9
Biscoito Cream Cracker				Biscoito Amanteigado			
Marca	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)	Marca	Valor Médio (mg 100 g ⁻¹)	t (95%)	CV (%)
E	7,8 ± 0,6	^a	6,9	M	4,7 ± 0,3	^a	5,4
F	5,9 ± 0,4	^c	6,3	N	4,2 ± 0,3	^a	7,2
G	6,5 ± 0,3	^b	4,2				
H	5,3 ± 0,2	^d	3,5				

* Valores expressos como média (n=3) ± intervalo de confiança, teste t (95%) e o coeficiente de variação (CV %). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Cabe ressaltar que não existe legislação específica para teor de ferro em biscoitos. A tabela TACO (2011) especifica que biscoitos tipo maisena e cream cracker devem conter 1,8 e 2,2 mg de ferro por 100 g⁻¹ de biscoito, respectivamente. A diferença entre os valores se deve ao fato dos dados apresentados nessa tabela terem sido obtidos antes da obrigatoriedade da fortificação de farinhas com ferro. Para os outros dois tipos de biscoitos não há relatos sobre o teor de ferro.

Doner & Ege (2004) determinaram ferro em três tipos de biscoitos por FAAS, comercializadas na Turquia e encontraram 11,0 a 16,0 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo infantil, 1,2 a 4,6 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo “petit beurre” e 1,5 a 1,8 mg de ferro 100 g⁻¹ em biscoito tipo salgado. Os teores de ferro encontrados nos biscoitos tipo água e sal e cream cracker apresentados na **Tabela 7** são superiores ao encontrados nesse trabalho, explicada pela diferença de formulação e do tipo de biscoito salgado.

Iwegbue (2012) determinou metais em amostras de biscoitos consumidos na Nigéria, e os teores de ferro encontrados nas amostras variaram de 3,4 – 10,9 mg 100 g⁻¹. O biscoito tipo cream cracker apresentou teor médio de ferro de 10,9 mg 100 g⁻¹ (0,4 a 36,4 mg 100 g⁻¹). Pode-se verificar que os valores encontrados de ferro na **Tabela 6** para o biscoito tipo cream cracker (5,0 a 8,6 mg 100 g⁻¹ em média 6,4 mg 100 g⁻¹) estão no intervalo de concentração informado nesse trabalho.

Considerando que o índice de ingestão diária (IDR) recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2004) para adultos, crianças de 1 a 6 anos, crianças de 7 a 10 anos e gestante é de 14, 6, 9 e 27 mg de ferro por dia, respectivamente, sendo o consumo de biscoito de 6,3 kg/pessoa/ano, a contribuição desse alimento para o IDR é 7,9, 18,5, 12,3 e 4,1%, respectivamente, para os biscoitos tipo água e sal e cream cracker. Para os biscoitos tipo maisena e amanteigado a contribuição do IDR é de 5,3, 12,3, 8,2 e 2,7%, respectivamente, devido ao menor teor de ferro presente nesses tipos de biscoitos.

4. Conclusão

O método utilizado para determinação de ferro em biscoitos apresentou valores adequados para repetitividade, precisão, exatidão e recuperação. Além disso, a avaliação de carbono residual indicou que a porção orgânica das matrizes foi praticamente eliminada no processo de mineralização. Os limites de detecção e quantificação apresentaram valores compatíveis para a determinação de ferro nas amostras e a linearidade se mostrou apropriada para as análises.

Os valores encontrados de ferro nos biscoitos demonstraram que existe diferença significativa entre lotes de mesma marca e também entre marcas do mesmo tipo. Notou-se que há necessidade de uma legislação mais específica para a adição de ferro as farinhas de trigo utilizadas como ingredientes, uma vez que os valores determinados de ferro nas amostras de biscoitos encontraram-se para a grande maioria, acima do valor recomendado para farinha de trigo (3,36 a 5,04 mg 100g⁻¹ em média 4,2 mg 100 g⁻¹), a fim de garantir o sucesso da campanha de fortificação.

5. Referências Bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA 12, **1978**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 269, **2005**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis, 15th Ed, vol. 2, 1990. Association of the Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists / William Howitz, editor ; George W. Latimer, Jr., assistant editor Gaithersburg, Maryland, 2006. 18th Ed.

BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.19, p.53-59, **2008**.

BOEN, T.R., SOEIRO, B.T., PEREIRA-FILHO, E.R., LIMA-PALLONE, J.A. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43 (4): p.589 - 596, **2007**.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.

BRASIL, 2007. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2007**.

BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24. Anexo II: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Diário Oficial, nº 138, jul. **2009**.

BRASIL, 2010. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2010**.

DONER, G., EGE, A., Evaluation of digestion procedures for the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 520, p. 217 – 222, **2004**.

FRAIGE, K., CRESPILO, F.N. E REZENDE, M.O.O. Determinação de zinco em solo utilizando colorimetria. *Química Nova*. v 30 (3), p. 588 - 591, **2007**.

GUTKOSKI, L.C.; BONAMIGO, J. M. A.; TEIXEIRA, D. M. F., PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 27(2), p. 355 - 363, **2007**.

HORWITZ, L. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analytical Chemistry*, 54, 67A, **1982**.

HURRELL, R.F., JACOBS, S. The role of the food industry in iron nutrition. Iron intake from industrial food products. *In*: Hallberg L., Asp., N. Iron nutrition in health and disease. England: John Libbey & Company Ltd., 341 - 346, **1996**.

IUPAC; HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl. Chem.*, v. 67 (2), p. 331 – 343, **1995**.

IWEGBUE, C.M.A., Metal contents in some brands of biscuits consumed in Southern Nigeria. *American Journal of Food Technology*. V. 7(3): p. 160 – 167, **2012**.

JALBANI, N., AHMED, F., GULKAZI, m dia T., RASHID, U., MUNSHI, A.B., KANDHRO, A., Determination of essential elements (Cu, Fe and Zn) in juices of commercially available in Pakistan. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48, p. 2737 – 2740, **2010**.

KINGSTON H.M.; JASSIE L.B. Introduction to microwave sample preparation – Theory and practice. American Chemical Society, **1988**.

LYNCH, S. R. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 18, p. 333 - 346, **2005**.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C.M., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27(5), p. 771 – 780, **2004**.

SARACOGLU, S., SAYGI, K.O., ULUOZLU, O.D., TUZEN, M., SOYLAK, M., Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. *Food Chemistry*, v. 105, p. 280 – 285, **2007**.

SOEIRO, B. T., BOEN, T. R., PEREIRA-FILHO, E. R., LIMA-PALLONE, J. A.,
Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por
Componentes Principais (PCA). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; Campinas,
30(3): 618-624, **2010**.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NEIMAN, T. A. Principles of instrumental analysis.
Saunders College Publishing, 849p. **1998**.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO) / NEPA –
UNICAMP - 4 ed. revisada e ampliada, Campinas, 161 p, **2011**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Worldwide prevalence of anaemia,
1993 – 2005, p. 51.

CAPÍTULO 3

Caracterização físico-química de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro.

Ana Paula Rebellato, ¹ Juliana Azevedo Lima Pallone

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Resumo

Os biscoitos são aceitos e consumidos mundialmente por pessoas de qualquer idade. Em 2002, através da Resolução nº 344, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu a obrigatoriedade da fortificação de farinhas de trigo e de milho com ferro. O alcance dos objetivos dos programas de fortificação de alimentos está relacionado também aos atributos físico-químicos, relacionados à qualidade que devem ser monitorados no produto final. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de ferro em biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada, além de acompanhar os parâmetros físico-químicos como umidade, acidez, índice de peróxido e teor de lipídeos, durante a estocagem. Foram analisadas quatro marcas de quatro tipos diferentes de biscoitos cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado, cada uma em três diferentes lotes, totalizando 41 amostras. Os métodos aplicados para a avaliação dos parâmetros físico-químicos foram validados e se mostraram adequados para as análises. Os valores médios obtidos variaram, para umidade de 1,8 a 6,4%, para acidez de 1,5 a 7,4 mg NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100g⁻¹, para o índice de peróxido a variação ocorreu de valor não detectado (nd) a 95,1 miliequivalente de peróxido kg⁻¹ de gordura ao longo do período de estocagem (0 a 150 dias). Para os teores de lipídeos e ferro, o menor e o maior valor médio encontrados foram 9,8 e 18,0% e 2,1 e 9,2 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Através da ANOVA e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança, foi possível verificar que existe diferença significativa para todos os parâmetros avaliados, para cada lote de mesma marca ao longo do período de estocagem. Observou-se que os teores de acidez e índice de peróxido estavam altos, para muitas amostras avaliadas, o que pode contribuir negativamente para a qualidade dos produtos disponíveis ao consumo durante a vida de prateleira. Não foi observada nenhuma correlação entre as variáveis estudadas.

Palavras chave: biscoitos, análises físico-químicas, vida de prateleira.

Abstract

Biscuits are well accepted and consumed worldwide by people of all ages. In 2002, ANVISA (Brazilian Regulatory Institute) established the obligation of enriching wheat and corn flours with folic acid and iron, by the resolution no. 344. The achievement of the food fortification programs also concerns about the physicochemical attributes related to quality, which have to be monitored in the ready-to-eat product. The objective of this work was to determine the iron concentration in biscuits produced with fortified wheat flour, as well as to monitor physicochemical parameters such as moisture, acidity, peroxide index and fat content during the storage. Four brands of four different types of biscuits were analyzed, each one in three different batches, in a total of 41 samples. The types of biscuits analysed were: cream cracker, salt and water, cornstarch cookies (maizena) and butter cookies. To evaluate physicochemical parameters methods applied were validated and shown to be adequate for the analyses. The average values varied, for moisture from 1.8 to 6.4%, for acidity from 1.5 to 7.4 mg NaOH (0.1 mol L^{-1}) 100 g^{-1} . For the peroxide index the variation was from non-detectable to 95.1 miliequivalents of peroxide kg^{-1} of fat throughout the storage period (150 days). For fat content, the lowest and highest values found were 9.8 and 18%, respectively. For iron, the content ranged from 2.1 to 9.2 mg 100 g^{-1} . There was significant difference for all the parameters evaluated, proved by ANOVA and Tukey test (95% of confidence). The acidity content and peroxide index were observed to be high for several of the analyzed samples, what might contribute negatively to the quality of the products available at the market during their shelf life. No correlation was observed among the variables studied.

Keywords: biscuits, physicochemical analyses, shelf-life.

1. Introdução

Biscoito ou bolacha é o produto obtido pelo amassamento e cozimento da massa preparada com farinhas, amidos e ou féculas, obtido de processo fermentado ou não, e outras substâncias alimentícias como açúcar, água, sal, manteiga ou gordura, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e texturas diferentes. A farinha de trigo é o composto em maior quantidade presente na formulação de biscoitos e é utilizada como veículo para a fortificação desse alimento com ferro (ANVISA, 1978; Gutkoski et al, 2007).

O ferro atua diretamente na prevenção da anemia ferropriva, um dos principais problemas de saúde pública mundial, decorrentes da sua deficiência. Em países em desenvolvimento a anemia atinge 52% das mulheres grávidas, 39% das crianças menores de 4 anos e 48% das crianças entre 5 e 11 anos (Cozzolino, 2005). Segundo World Health Organization (WHO, 1993 – 2005) existe 1,6 bilhões de pessoas anêmicas em todo mundo causada pela deficiência da ingestão de ferro. A fortificação de alimentos com ferro tem sido apontada como o processo mais eficiente para a redução da prevalência da deficiência desse nutriente (Hurrell, 1987). Em diversos países, há vários anos se pratica o enriquecimento de farinhas com ferro.

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução nº 344 de 13 de dezembro de 2002 determinou o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico ($150 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e ferro ($4,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia, já que essas farinhas são largamente consumidas pela população brasileira (ANVISA, 2002).

Além do aspecto nutricional, o alcance dos programas de fortificação de alimentos está relacionado aos atributos físico-químicos que devem ser monitorados no veículo utilizado para a adição de nutriente e no produto final. Huma et al. (2007) verificaram que durante a estocagem de farinhas fortificadas com ferro foi observada oxidação de lipídeos e desenvolvimento de rancidez, ocasionados pela adição de ferro.

O ferro apresenta facilidade em catalisar reações de radicais livres formando oxidantes tóxicos que podem causar danos às células e tecidos (Worwood, 1996). Os danos induzidos pelos radicais livres podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e as vitaminas presentes nos alimentos.

Além disso, o estudo sobre o mecanismo de lesão oxidativa no organismo humano tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a essas lesões. O ferro é o metal mais capacitado para catalisar as reações de oxidação das biomoléculas (Aust et al., 1991). As reações de Fenton e Harber-Weiss descrevem a participação do ferro nos danos oxidativos *in vitro*. O processo de lipoperoxidação pode ser iniciado por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos (Borg et al., 1987).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com o surgimento de várias doenças incluindo enfisema, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata, cardiopatias, artrite e diabetes, entre outras (Bianchi et al., 1999). Os danos causados ao DNA também desempenham papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Poulsen et al., 1998, Barbosa et al., 2006).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de ferro em biscoitos elaborados com farinhas de trigo fortificadas ao longo da estocagem e acompanhar os parâmetros físico-químicos como, umidade, acidez, peróxido e teor de lipídeos durante 150 dias de armazenamento.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e Soluções

Para as determinações de índice de peróxido, índice de acidez e teor de lipídeos foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: ácido acético glacial; ácido clorídrico concentrado; sulfato de sódio anidro; hidróxido de sódio; clorofórmio; metanol; indicador de fenolftaleína; iodeto de potássio, todos marca Synth. Amido de batata (S2004 - Sigma-Aldrich) foi utilizado como indicador para a determinação do índice de peróxido.

Para a determinação do teor de ferro foram utilizados ácido nítrico (Synth) e peróxido de hidrogênio (Synth), de grau analítico.

Os padrões utilizados foram: solução padrão de ferro 1000 mg g⁻¹, PAFE 1000-0125, rastreado ao SEM 136e, NIST-USA (Quemis) e material de referência certificado (MRC) de farinha de trigo, 1567a (NIST).

No preparo das soluções utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q, (modelo Plus - Millipore, EUA). Papéis de filtro qualitativo de gramatura (80 gr) foram usados para filtrar as soluções. Papéis de filtro qualitativo de 9 cm de diâmetro e gramatura (80 gr) foram usados para filtrar as solução ácida digerida.

2.2 Equipamentos e Vidrarias

As amostras foram trituradas em moinho (modelo A11 - Ika) e pesadas em balança analítica (modelo AP210-0 - Ohaus) durante o preparo das amostras.

Estufa para esterilização e secagem (modelo 400-3ND - Nova ética); agitador de tubos tipo Wagner (modelo MA 160/50/CF - Marconi) foi utilizada para a determinação de umidade, assim como para a determinação do teor de lipídeos. Um bloco digestor (modelo M242 - Quimis) foi utilizado para a mineralização das amostras e um banho ultra-sônico (modelo 1510 - Branson) foi utilizado para melhorar a solubilização das amostras ao final do processo de mineralização para a análise de ferro.

Cadinhos de alumínio (metalúrgica Leonardo) e dessecador de 250 mm (Satelit) foram utilizados durante o preparo e determinações experimentais das amostras de biscoito.

Vidrarias como: balões volumétricos, pipetas graduadas e volumétricas, frascos de vidro, béquers, erlenmeyers, kitassato, tubos de ensaio com tampa e rosca (30mL), funis, tubos de vidro com 25 cm de comprimento, 2 cm de diâmetro interno e 2 mm de espessura da parede e funis com dimensões de 3 cm de diâmetro e 8 cm de comprimento foram utilizados durante o preparo das amostras e desenvolvimento das análises.

Quando necessário as soluções preparadas foram armazenadas sob-refrigeração (Refrigerador duplex, Consul).

As análises espectrométricas para a determinação do teor de ferro foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com chama (modelo AAnalyst 200 - Perkin Elmer), com lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e lâmpada de cátodo oco para determinação de ferro (248,3 nm).

Pipetas automáticas de volumes variáveis: 10 a 100 μL e 100 a 1000 μL (Labmate), foram utilizadas para o preparo de soluções e da curva analítica.

2.3 Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias usadas na determinação do teor de ferro foram lavadas em banho de detergente (imersão por no mínimo 6 horas) e enxaguadas com água da torneira até total eliminação de espumas, em seguida foram imersas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por, no mínimo, 12 horas. Após esse tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água purificada pelo sistema Milli-Q. A secagem ocorreu a temperatura ambiente, protegidas com papel toalha para evitar poeira e re-contaminações.

2.4 Amostras

Para o desenvolvimento da validação dos métodos analíticos foram adquiridas amostras de biscoito (água e sal, cream cracker, maisena e amanteigado).

Para o acompanhamento dos parâmetros de qualidade e do teor de ferro durante o período de estocagem as amostras de biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro foram adquiridas com a maior data de validade possível em supermercados da cidade de Campinas – SP, perfazendo 3 tipos (cream cracker, água e sal e maisena), para cada tipo foram compradas 4 marcas. De cada marca foram adquiridos 3 lotes. Exceção ocorreu para o tipo amanteigado que foi adquirido apenas 2 marcas, sendo 1 marca com 3 lotes e outra com 2 lotes, totalizando 41 amostras. Cada lote foi formado por 6 embalagens de biscoito e mensalmente um pacote de cada tipo, marca e lote foram abertos para análises por um período de 150 dias.

Para a realização das análises, de cada pacote de biscoito foram retirados 100 g de biscoito, foram moídos e pesados para realização das determinações. Os pacotes foram armazenados em prateleiras e expostos às condições ambientais simulando um acondicionado na prateleira do supermercado.

Como as amostras foram adquiridas no comércio, apesar de toda preocupação na obtenção de lotes de fabricação mais recentes possíveis, alguns biscoitos chegaram ao final do prazo de validade antes de 150 dias. Por isso, alguns dados não puderam ser obtidos. Para a caracterização das matrizes foi considerado tempo zero, amostras que tinham de 2 a 4 meses de fabricação.

2.5 Determinação de umidade e avaliação da repetitividade em amostras de biscoito

Para a determinação do teor de umidade foi utilizado o processo de secagem em estufa baseado na remoção da água por aquecimento. Aproximadamente 3,0 g das amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio, previamente pesados e mantidos em estufa por 3 horas a 100°C. Os cadinhos

contendo as amostras foram, então, resfriados a temperatura ambiente, em dessecador e pesados. Logo após a pesagem os cadinhos retornaram à estufa e este procedimento foi repetido até peso constante. O teor de umidade foi calculado como a diferença entre a massa inicial e final da amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicatas. (Association of Official Agricultural Chemists – AOAC, 2006).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (procedimento, analista, instrumento, local e no menor espaço de tempo possível). As amostras de biscoito foram analisadas em sete repetições independentes, em condições de repetitividade. A partir dos resultados medidos, foi calculado o desvio padrão amostral (s) e a repetitividade foi expressa como coeficiente de variação (CV).

2.6 Determinação de acidez álcool solúvel

Para a determinação da acidez álcool solúvel foram pesados 10 g de amostra de biscoitos em um erlenmeyer de 125 mL com tampa e adicionado 50 mL de etanol 67% v/v. O frasco foi agitado por 5 minutos. Posteriormente, 25 mL do sobrenadante foram transferidos para outro erlenmeyer de 125 mL e adicionadas algumas gotas de solução indicadora de fenolftaleína. Foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até aparecimento de coloração rósea persistente. Um teste do branco foi realizado, utilizando o etanol, como descrito por Pizzinatto, (1997). A acidez foi expressa em mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH por 100 g de biscoito e calculada pela equação 1.

Equação 1

$$\frac{(V - V') * f * 100}{P * c}$$

Sendo:

V = volume (mL) da solução de NaOH gasto na titulação da amostra;

V' = volume (mL) da solução de NaOH gasto na titulação do branco;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ ou 0,1 mol L⁻¹;

P = massa de amostra utilizada (g);

c = fator de correção (10 para a solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e 100 para a solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹).

2.6.1 Avaliação da precisão da metodologia para determinação de acidez álcool solúvel

A precisão da metodologia para a determinação de acidez álcool solúvel foi avaliada em condições de repetitividade e de precisão intermediária. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de sete repetições independentes de amostras de biscoitos. O fator de variação foi a realização das análises em três dias diferentes (tempos diferentes). Os valores obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), técnica pela qual é possível isolar e estimar as variâncias que contribuem para a variação total do experimento. Ela permite identificar quais as variâncias são relevantes e estabelece meios para estimar seus efeitos. É avaliada a variância dentro de um grupo e entre grupos. Foi utilizada a ANOVA com um fator de classificação para avaliar a influência entre dias.

2.7 Determinação do índice de peróxidos

A metodologia foi utilizada de acordo com Silva et al. (2010). A alteração realizada consiste na determinação do índice de peróxidos (miliequivalentes de peróxido 1000 g⁻¹ de gordura), (*American Oil Chemists' Society* - AOCS Cd 8-53), diretamente na fração lipídica (miscela com clorofórmio) resultante da extração pelo procedimento de Bligh & Dyer (1959). Para 12 mL da miscela com clorofórmio foi adicionado 18 mL de ácido acético e 1,0 mL de solução de iodeto de potássio saturado. Foi aguardado um minuto para a reação, mantendo o erlenmeyer protegido da luz. Foi adicionado 30 mL de água destilada e procedeu a titulação com solução de tiossulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹, com agitação até que a coloração amarela tivesse quase desaparecido. Então, foi adicionado 2,0 mL de

solução indicadora de amido 1% e foi titulado até mudança da coloração amarela para coloração branca. A determinação do branco foi realizada pelo mesmo procedimento, onde foi adicionando 12 mL de clorofórmio em substituição aos 12 mL de miscela. O índice de peróxido foi calculado através da equação 2 prevista no método oficial.

Equação 2

$$\frac{(S - B) * M * 1000}{m}$$

Sendo:

S = volume de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mol.L⁻¹ gasto na titulação da amostra

B = volume de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mol.L⁻¹ gasto na titulação do branco

M = mol L⁻¹ da solução de tiossulfato de sódio

m = massa de gordura na amostra (g)

2.7.1 Validação da metodologia para a determinação de índice de peróxidos

A metodologia para a determinação de índice de peróxido foi baseada no método oficial (AOCS Cd 8-53), com algumas adaptações, de acordo com Silva et al (2010). Nesse caso, os parâmetros de validação avaliados foram: repetitividade, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação.

O parâmetro repetitividade foi analisado em sete repetições independentes e foi expressa como CV amostral. Os valores de CV obtidos foram comparados com a equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$, onde C é a fração de massa expressa como exponencial de 10) o que é justificado uma vez que esta equação expressa a dependência entre a variância e a concentração do analito, assumindo resultados obtidos por métodos diferentes em ensaios inter-laboratórios (INMETRO, 2010; Paschoal et al, 2008).

Para avaliação da precisão intermediária, as análises foram realizadas no mesmo laboratório (mesmo analista, mesmo equipamento) em três dias distintos. As determinações foram realizadas em sete repetições independentes, em três

dias diferentes. A precisão intermediária foi avaliada através de Análise de Variância (ANOVA) de fator único, com 95% de confiança.

Quanto ao limite de detecção (LD), segundo o INMETRO (BRASIL, 2010), para a validação de um método analítico, normalmente é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), no caso de métodos não instrumentais (titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc). Nesse caso, o LD foi estimado através da determinação de concentrações decrescentes do analito (diluições sucessivas da amostra com concentração conhecida) a fim de verificar a menor concentração em que seria possível distinguir a amostra teste da amostra branco.

O limite de quantificação (LQ) corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. Esse parâmetro pode ser calculado utilizando o valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Todavia, a maneira mais realista é determinar o LQ experimentalmente com base em critérios de aceitação pré-definidos (BRASIL, 2010). No caso da metodologia para índice de peróxidos não é possível obter medidas de brancos da amostra (isentos de peróxido), pois mesmo as amostras mais novas de biscoitos apresentam uma concentração inicial de analito. Dessa forma, optou-se por estimar o LQ através de testes de precisão no menor nível de concentração possível de ser encontrado nas amostras, ou seja, em amostras com data de fabricação recente e com embalagens abertas no momento das análises.

2.8 Determinação do teor de lipídeos

A determinação do teor de lipídeos foi baseada no procedimento descrito por Bligh & Dyer (1959), onde 3 g de biscoito foram pesados em tubos com rosca

aos quais foram adicionados 8 mL de água destilada, 10 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol e submetidos a agitação no agitador de tubos tipo Wagner por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e submetidos a agitação por mais 2 minutos. Deixou-se separar as camadas de forma natural por 1 hora e então a fase superior foi sugada (metanol e água) em sistema ligado a trompa de vácuo com kitassato. Aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro foi adicionado ao tubo a fim de eliminar traços de água, seguido de agitação e posterior filtragem através de funil e papel de filtro. Posteriormente foi pipetado 5 mL do filtrado em béquer previamente tarado e submetido a secagem em estufa a 100°C até a evaporação do solvente. O resfriamento e a pesagem foram repetidos até a obtenção de peso constante. O percentual de lipídeos totais foi calculado e expresso em g óleo 100 g⁻¹ (%) de amostra de biscoito.

Por tratar-se de um método oficial amplamente utilizado, foi julgado desnecessário efetuar a validação para essa análise.

2.9 Determinação do teor de ferro em biscoitos por FAAS

As amostras foram trituradas em moedor até adquirirem aspecto de pó, seguido de processo de homogeneização. Foi pesado 0,60 g de cada tipo de amostra em tubos de digestão. Foi adicionado 8 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Um tubo de “branco” (sem a amostra) também foi preparado. Em seguida, foram colocados pequenos funis na entrada de cada tubo de digestão, a fim de manter o refluxo e os mesmos foram levados ao bloco digestor para início do aquecimento. Os tubos foram aquecidos por 2 horas a temperatura de 110°C. Após este processo, os tubos foram retirados do bloco e aguardou-se o resfriamento. Foram adicionados 5 mL de água aos tubos de digestão e em seguida foram submetidos ao banho de ultra-som por 5 minutos. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água. Foram então filtradas em papel de filtro e armazenadas em

frasco de plástico para determinação do teor de ferro, realizadas em triplicata, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

Para essa avaliação foi utilizado o método validado por Rebellato et.al (2012) (dissertação de mestrado: Método analítico para determinação de ferro por FAAS: validação e aplicação em amostras de biscoitos, cap. 2).

2.10 Análise estatística

Os valores obtidos para cada lote de uma mesma marca foram comparados mensalmente através da análise de variância (ANOVA) e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança, utilizando o software *Statistica 7,0* (Statsoft, USA).

3 Resultados e Discussões

3.1 Determinação de umidade e avaliação da repetitividade em amostras de biscoitos.

Por se tratar de um método oficial, a metodologia foi avaliada somente em relação à repetitividade. As amostras de biscoitos de fabricação recente e cujas embalagens foram abertas no momento das análises foram avaliadas em sete repetições independentes. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o desvio padrão amostral (s) e a repetitividade foi expressa como coeficiente de variação (CV).

Para a determinação da umidade, as amostras de biscoitos foram secas em estufa até peso constante. Para tanto, foram avaliadas a cada 3 horas e foi verificado que o tempo de permanência de 24 horas na estufa foi o necessário para obtenção de peso constante.

Os resultados obtidos em condições de repetitividade são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Umidade dos biscoitos medida em condições de repetitividade.

Amostras	Teor de umidade (%)			
Replicatas	maisena	amanteigado	cream cracker	água e sal
1	2,7	3,7	3,2	3,8
2	2,7	3,7	3,2	3,7
3	2,6	3,7	3,4	3,7
4	2,5	3,7	3,3	3,8
5	2,6	3,6	3,3	3,8
6	2,5	3,6	3,4	3,8
7	2,6	3,7	3,3	3,7
Média	2,6	3,7	3,3	3,8
Estimativa do desvio padrão (s)	0,06	0,05	0,06	0,04
Coeficiente de variação (%)	2,4	1,5	1,9	1,2

Foi adotado como referência o valor preconizado pela ANVISA de coeficiente de variação inferior a 5%. Como o maior valor encontrado de CV no

ensaio foi de 2,4% para o biscoito tipo maisena pode-se considerar que a repetitividade do método é adequada para aplicação nos diferentes tipos de biscoitos.

Para o acompanhamento da umidade nas amostras de biscoitos ao longo da estocagem, mensalmente, um pacote de biscoito foi aberto. Cerca de 100 g de cada amostra foram moídas e homogeneizadas para realização das análises. O acompanhamento da umidade nos biscoitos foi realizado num período total, em média, de 150 dias. As determinações dos valores de umidade (%) em relação ao período de estocagem estão apresentadas na **Tabela 2**.

De acordo com a **Tabela 2**, os valores médios das triplicatas para a umidade variaram, para os biscoitos tipo água e sal (A, B, C e D) de 2,9 a 6,4%, para o tipo cream cracker (E, F, G e H) de 3,1 a 6,2%. Para os biscoitos doces, tipo maisena (I, J, K e L) de 1,8 a 4,7% e os tipo amanteigados apresentaram variação de 2,6 a 5,3% de umidade para as marcas M e N, respectivamente.

Na **Tabela 2** foi verificado também que a grande maioria dos tipos de biscoito teve diferença no teor de umidade com o transcorrer do tempo, verificado pela comparação entre os tempos (dias) através da ANOVA e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança. A variação na umidade pode ser explicada pela embalagem não apresentar boas propriedades de barreira à umidade, principalmente na solda, possibilitando o aumento de umidade de acordo com as condições do ambiente.

Tabela 2. Valores da umidade (expresso em %) em amostras de biscoitos durante o período de estocagem.

		Dias de estocagem																							
Marca	Lote	0			30			60			90			120			150								
Biscoito água e sal																									
A	1	4,09	±	0,09	^b	4,5	±	0,1	^a	2,9	±	0,1	^c	4,09	±	0,07	^b	*	±	*	*	±	*		
	2	4,99	±	0,07	^a	4,53	±	0,06	^b	4,4	±	0,2	^b	3,90	±	0,09	^c	*	±	*	*	±	*		
	3	5,76	±	0,06	^a	5,64	±	0,07	^a	4,26	±	0,04	^c	4,8	±	0,2	^b	5,09	±	0,02	^b	*	±	*	
B	1	2,39	±	0,05	^e	2,24	±	0,04	^e	2,59	±	0,05	^d	3,2	±	0,1	^c	3,38	±	0,03	^b	3,98	±	0,02	^a
	2	3,7	±	0,1	^c	3,16	±	0,01	^d	4,15	±	0,08	^b	3,57	±	0,08	^c	4,2	±	0,1	^b	4,49	±	0,03	^a
	3	2,86	±	0,09	^c	2,53	±	0,00	^d	4,2	±	0,1	^a	3,34	±	0,03	^b	3,52	±	0,04	^b	4,24	±	0,03	^a
C	1	5,00	±	0,01	^a	4,12	±	0,01	^b	3,04	±	0,03	^d	3,86	±	0,03	^c	*	±	*	*	±	*		
	2	4,55	±	0,01	^b	4,14	±	0,06	^c	3,6	±	0,1	^e	3,91	±	0,04	^d	5,00	±	0,05	^a	*	±	*	
	3	5,2	±	0,1	^b	4,8	±	0,2	^c	3,68	±	0,06	^e	4,40	±	0,04	^d	5,59	±	0,06	^a	5,47	±	0,04	^a
D	1	5,04	±	0,04	^a	4,05	±	0,02	^b	3,10	±	0,07	^c	5,0	±	0,1	^a	4,08	±	0,07	^a	*	±	*	
	2	5,68	±	0,06	^{bc}	5,4	±	0,2	^c	3,18	±	0,04	^e	6,35	±	0,03	^a	4,8	±	0,2	^d	5,7	±	0,1	^b
	3	4,83	±	0,06	^b	4,9	±	0,2	^b	4,10	±	0,07	^c	5,36	±	0,07	^a	4,30	±	0,04	^c	*	±	*	
Biscoito cream cracker																									
E	1	4,40	±	0,04	^b	3,93	±	0,07	^c	5,02	±	0,06	^a	4,43	±	0,05	^b	4,04	±	0,08	^c	*	±	*	
	2	5,3	±	0,1	^a	3,81	±	0,07	^d	4,38	±	0,05	^c	4,94	±	0,05	^b	4,3	±	0,1	^c	5,0	±	0,1	^b
	3	5,3	±	0,2	^b	4,1	±	0,1	^d	4,62	±	0,03	^c	4,99	±	0,07	^b	4,08	±	0,05	^d	5,8	±	0,2	^a
F	1	4,12	±	0,07	^c	4,11	±	0,03	^c	5,09	±	0,09	^b	4,91	±	0,08	^b	4,97	±	0,02	^b	5,6	±	0,3	^a
	2	3,70	±	0,05	^d	3,5	±	0,1	^d	4,76	±	0,03	^{bc}	4,69	±	0,08	^c	4,97	±	0,04	^b	5,3	±	0,1	^a
	3	3,61	±	0,06	^c	3,59	±	0,05	^c	4,51	±	0,04	^b	4,5	±	0,1	^b	4,73	±	0,09	^b	5,2	±	0,2	^a
G	1	4,38	±	0,03	^a	4,6	±	0,1	^a	4,9	±	0,2	^a	4,9	±	0,5	^a	4,66	±	0,01	^a	5,0	±	0,2	^a
	2	4,2	±	0,2	^b	4,28	±	0,07	^b	4,8	±	0,1	^a	4,40	±	0,03	^b	4,45	±	0,07	^b	*	±	*	
	3	4,5	±	0,2	^c	4,50	±	0,07	^c	5,3	±	0,1	^a	5,09	±	0,03	^{ab}	4,57	±	0,04	^c	4,90	±	0,03	^b
H	1	4,81	±	0,05	^d	4,75	±	0,06	^d	5,79	±	0,02	^b	5,3	±	0,2	^c	6,10	±	0,08	^a	6,10	±	0,08	^a
	2	3,06	±	0,02	^d	4,3	±	0,1	^b	5,30	±	0,03	^a	4,0	±	0,2	^c	4,39	±	0,06	^b	*	±	*	
	3	4,78	±	0,08	^d	4,93	±	0,07	^d	5,82	±	0,03	^b	5,29	±	0,08	^c	6,23	±	0,08	^a	6,23	±	0,08	^a

Tabela 2. (Continuação)

		Dias de estocagem																	
Marca	Lote	0		30		60		90		120		150							
Biscoito maisena																			
I	1	1,80	± 0,04	^{ab}	1,90	± 0,08	^d	2,96	± 0,06	^{bc}	2,91	± 0,05	^{cd}	3,22	± 0,09	^{cd}	3,1	± 0,1	^a
	2	1,77	± 0,06	^d	4,64	± 0,07	^c	2,71	± 0,03	^b	2,71	± 0,06	^c	2,8	± 0,3	^a	3,4	± 0,3	^a
	3	1,91	± 0,02	^d	4,66	± 0,06	^a	3,40	± 0,03	^b	2,83	± 0,04	^c	2,8	± 0,2	^c	3,02	± 0,08	^c
J	1	2,8	± 0,1	^d	4,58	± 0,05	^a	3,72	± 0,05	^b	3,63	± 0,04	^b	3,04	± 0,03	^c	4,4	± 0,1	^a
	2	2,0	± 0,1	^d	4,74	± 0,08	^a	3,4	± 0,2	^b	3,1	± 0,2	^b	2,6	± 0,1	^c	3,3	± 0,1	^b
	3	2,78	± 0,02	^c	1,99	± 0,02	^d	3,84	± 0,07	^a	3,1	± 0,1	^{bc}	3,3	± 0,2	^{bc}	3,5	± 0,4	^{ab}
K	1	2,54	± 0,08	^c	2,01	± 0,07	^d	3,0	± 0,1	^b	3,36	± 0,08	^a	3,2	± 0,2	^{ab}	*	± *	
	2	3,00	± 0,09	^b	2,61	± 0,05	^b	2,92	± 0,03	^b	3,83	± 0,01	^a	4,2	± 0,4	^a	4,0	± 0,2	^a
	3	2,7	± 0,2	^c	2,19	± 0,08	^d	3,00	± 0,07	^b	3,70	± 0,07	^a	3,61	± 0,05	^a	3,74	± 0,01	^a
L	1	3,69	± 0,00	^c	3,21	± 0,05	^e	3,4	± 0,1	^d	4,16	± 0,06	^a	3,94	± 0,06	^b	3,86	± 0,05	^{bc}
	2	3,70	± 0,06	^c	3,33	± 0,05	^d	3,12	± 0,05	^e	4,00	± 0,06	^a	3,89	± 0,03	^{ab}	3,82	± 0,05	^{bc}
	3	3,82	± 0,05	^{ab}	3,47	± 0,03	^b	3,71	± 0,09	^{ab}	3,97	± 0,05	^a	3,74	± 0,06	^{ab}	4,1	± 0,5	^a
Biscoito amanteigado																			
M	1	3,35	± 0,02	^e	3,42	± 0,05	^e	3,59	± 0,05	^d	4,52	± 0,04	^a	4,09	± 0,05	^c	4,22	± 0,03	^b
	2	2,60	± 0,07	^c	3,35	± 0,02	^b	3,13	± 0,03	^{bc}	4,1	± 0,1	^a	4,2	± 0,4	^a	*	± *	
N	1	4,12	± 0,06	^b	3,89	± 0,06	^c	5,30	± 0,07	^a	4,00	± 0,08	^{bc}	*	± *		*	± *	
	2	3,44	± 0,01	^c	3,75	± 0,02	^b	4,83	± 0,08	^a	3,81	± 0,05	^b	*	± *		*	± *	
	3	3,52	± 0,03	^b	3,60	± 0,06	^b	4,87	± 0,03	^a	3,6	± 0,1	^b	*	± *		*	± *	

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra na linha, ao longo do tempo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (95%).

(*) Valores não determinados devido os biscoitos estarem fora do prazo de validade.

A legislação brasileira (ANVISA – BRASIL, 1978) determina que o teor de umidade máximo permitido em biscoitos não deve ser superior a 14%. Dessa forma, todas as amostras analisadas estão em acordo com as especificações da legislação até o final de 150 dias de armazenamento. A tabela brasileira de composição de alimentos (TACO, 2011), indica o teor de umidade para dois tipos de biscoito cream cracker e maisena que devem corresponder a 4,1 e 3,2%, respectivamente. Quando os valores determinados para estes tipos de biscoitos são comparados com a tabela em questão, verifica-se que o biscoito tipo cream cracker apresenta teor de umidade maior que o apresentado pela tabela para todas as marcas, em alguns lotes ao longo do tempo. O que também ocorreu para o biscoito tipo maisena.

Em relação aos valores obtidos não foi observado nenhuma tendência de comportamento. O tempo de armazenamento não parece ser um fator que contribua para o aumento ou diminuição no teor de umidade por si só, mas, as condições ambientais (maior ou menor umidade do ar) são relevantes para a conduta verificada.

3.2 Avaliação da precisão e determinação de acidez álcool solúvel em amostras de biscoitos

3.2.1 Avaliação da precisão

A precisão da metodologia para a determinação de acidez em biscoitos foi avaliada em condições de repetitividade e de precisão intermediária pela análise de sete repetições independentes nos quatro tipos de biscoitos. O fator de variação foi a realização das análises em três dias diferentes. Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valor de acidez determinados em condições de repetitividade e precisão intermediária para os tipos de biscoito.

Tipos de biscoito	Precisão	CV (%)	HORWITZ CV (%)
Precisão intra-dia			
água e sal (n=7)	1,2	2,8	6,8
cream cracker (n=7)	1,0	6,7	
maisena (n=7)	1,3	1,4	
amanteigado (n=7)	0,9	1,9	
Precisão inter-dias (3 dias)			
água e sal (n=3)	1,2	1,7	
cream cracker (n=3)	1,0	5,8	
maisena (n=3)	1,3	1,3	
amanteigado (n=3)	0,9	3,4	

CV (%) = coeficiente de variação; precisão é expressa em (mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100g⁻¹ amostra).

Os valores de coeficiente de variação encontrados variaram de 1,4 a 6,7% para os tipos de biscoitos. Esses valores foram comparados com a equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$), que estabelece para ensaios de repetitividade intra-laboratorial que o CV calculado deve ser menor que o CV obtido pela equação, especificação esta, que foi comprovada através da comparação dos resultados de CV para os diferentes tipos de biscoitos. Foi possível afirmar que o teste de precisão através da repetitividade indicou que o método está adequado para análise de acidez.

A precisão intermediária, com um fator de classificação, foi avaliada por análise de variância (ANOVA) para avaliar a influência entre os dias e os valores encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária.

Biscoito Cream Cracker					Biscoito Água e Sal				
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F
Inter-dias	0,005	2	0,002	0,64	Inter-dias	0,002	2	0,001	1,06
Intra-dias	0,067	18	0,004		Intra-dias	0,016	18	0,001	
Total	0,072	20			Total	0,018	20		

Biscoito Amanteigado					Biscoito Maisena				
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F
Inter-dias	0,002	2	0,001	1,06	Inter-dias	0,001	2	0,000	1,24
Intra-dias	0,016	18	0,001		Intra-dias	0,005	18	0,000	
Total	0,018	20			Total	0,006	20		

AQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = média da soma dos quadrados

De acordo com a **Tabela 4**, os valores de F calculado foram inferiores ao valor de F tabelado ao nível de confiança de 95% (3,55). Como os valores de F calculado são menores que F tabelado para os quatro tipos de biscoitos, se conclui que a determinação da acidez álcool solúvel em diferentes dias não resultou em médias estatisticamente diferentes.

3.2.2 Determinação de acidez álcool solúvel em amostras de biscoitos

Após a avaliação da precisão do método analítico, a etapa seguinte foi a realização da determinação da acidez álcool solúvel nas matrizes de biscoito durante a vida de prateleira. Para isso, mensalmente pacotes de biscoito de cada tipo, marca e lote foram abertos e aproximadamente 100 g de biscoito foram moídos, homogeneizados, pesados e submetidos ao procedimento conforme descrição no item 2.6.

Os valores de acidez (expresso em mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100 g⁻¹ amostra) determinados nos biscoitos tipo cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado durante o período de estocagem estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores de acidez álcool solúvel (expresso em mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ 100 g⁻¹) em amostras de biscoitos durante o período de estocagem.

		Dias de estocagem																	
Marca	Lote	0		30		60		90		120		150							
Biscoito água e sal																			
A	1	2,15	± 0,00	^d	2,70	± 0,06	^c	3,0	± 0,1	^b	3,39	± 0,06	^a	*	± *	*	± *		
	2	2,12	± 0,05	^d	2,8	± 0,1	^c	3,1	± 0,1	^b	3,49	± 0,06	^a	*	± *	*	± *		
	3	2,18	± 0,06	^d	2,82	± 0,09	^c	2,93	± 0,00	^c	3,52	± 0,01	^a	3,6	± 0,1	^a	3,2	± 0,1	^b
B	1	6,25	± 0,00	^a	5,7	± 0,1	^c	6,16	± 0,00	^{ab}	6,11	± 0,07	^{ab}	6,0	± 0,1	^b	6,11	± 0,05	^{ab}
	2	6,42	± 0,02	^e	6,85	± 0,00	^d	6,96	± 0,04	^c	7,03	± 0,05	^c	7,20	± 0,06	^b	7,39	± 0,04	^a
	3	6,4	± 0,3	^b	6,8	± 0,1	^{ab}	6,97	± 0,03	^a	7,03	± 0,06	^a	7,1	± 0,1	^a	7,13	± 0,06	^a
C	1	2,74	± 0,00	^d	3,15	± 0,10	^c	3,9	± 0,1	^a	3,6	± 0,1	^b	*	± *	*	± *		
	2	2,35	± 0,00	^d	3,1	± 0,1	^c	3,85	± 0,05	^b	3,9	± 0,1	^b	4,19	± 0,06	^a	*	± *	
	3	2,54	± 0,01	^d	3,1	± 0,1	^c	3,52	± 0,00	^b	3,57	± 0,06	^b	3,9	± 0,1	^a	3,62	± 0,00	^b
D	1	2,32	± 0,06	^c	2,83	± 0,00	^b	3,0	± 0,1	^b	3,46	± 0,06	^a	3,47	± 0,06	^a	*	± *	
	2	2,53	± 0,02	^d	3,03	± 0,01	^c	3,29	± 0,06	^b	3,53	± 0,00	^a	3,57	± 0,05	^a	3,56	± 0,05	^a
	3	2,28	± 0,06	^c	2,73	± 0,01	^b	2,74	± 0,00	^b	3,40	± 0,06	^a	3,40	± 0,05	^a	*	± *	
Biscoito tipo cream Cracker																			
E	1	2,54	± 0,01	^d	2,99	± 0,05	^c	3,20	± 0,06	^b	3,2	± 0,1	^b	3,40	± 0,06	^a	*	± *	
	2	2,70	± 0,06	^d	3,08	± 0,07	^c	3,18	± 0,06	^c	3,73	± 0,01	^b	3,60	± 0,06	^b	4,45	± 0,06	^a
	3	2,7	± 0,1	^d	3,28	± 0,05	^c	3,45	± 0,06	^{bc}	3,7	± 0,1	^{ab}	3,66	± 0,05	^{ab}	3,9	± 0,1	^a
F	1	2,92	± 0,01	^c	4,16	± 0,05	^b	4,10	± 0,01	^b	4,48	± 0,06	^a	4,4	± 0,1	^a	4,4	± 0,1	^a
	2	3,0	± 0,1	^d	3,70	± 0,09	^c	3,88	± 0,06	^{ab}	4,0	± 0,2	^{ab}	4,2	± 0,2	^{ab}	4,1	± 0,1	^a
	3	2,70	± 0,06	^c	3,7	± 0,2	^{ab}	3,39	± 0,05	^b	3,8	± 0,1	^a	3,83	± 0,09	^a	3,8	± 0,1	^a
G	1	2,35	± 0,01	^d	3,03	± 0,00	^c	3,65	± 0,07	^b	3,66	± 0,05	^b	3,73	± 0,01	^{ab}	3,8	± 0,1	^a
	2	2,22	± 0,06	^d	3,16	± 0,06	^c	3,24	± 0,06	^c	3,57	± 0,06	^b	3,8	± 0,1	^a	*	± *	
	3	2,15	± 0,01	^e	3,23	± 0,00	^d	3,71	± 0,01	^c	3,8	± 0,1	^{bc}	4,2	± 0,1	^a	4,0	± 0,1	^{ab}
H	1	2,18	± 0,05	^d	2,67	± 0,05	^c	2,87	± 0,06	^b	3,46	± 0,06	^a	3,46	± 0,06	^a	3,57	± 0,06	^a
	2	1,89	± 0,06	^d	2,45	± 0,00	^c	2,70	± 0,06	^b	2,87	± 0,05	^a	3,01	± 0,06	^a	*	± *	
	3	1,95	± 0,01	^d	2,44	± 0,01	^c	2,48	± 0,06	^c	2,87	± 0,05	^b	2,88	± 0,06	^b	3,11	± 0,06	^a

Tabela 5. (Continuação)

		Dias de estocagem																	
Marca	Lote	0		30		60		90		120		150							
Biscoito maisena																			
I	1	2,64	± 0,09	^c	2,41	± 0,06	^c	3,36	± 0,06	^b	3,50	± 0,06	^b	4,09	± 0,05	^a	4,0	± 0,2	^a
	2	1,95	± 0,00	^d	2,53	± 0,01	^c	2,67	± 0,05	^b	2,58	± 0,06	^{bc}	2,91	± 0,06	^a	2,55	± 0,00	^c
	3	2,34	± 0,01	^d	2,90	± 0,06	^c	3,19	± 0,06	^b	3,50	± 0,06	^a	3,6	± 0,1	^a	3,7	± 0,1	^a
J	1	1,56	± 0,00	^b	1,89	± 0,05	^a	1,88	± 0,06	^a	1,99	± 0,06	^a	2,0	± 0,1	^a	1,8	± 0,1	^a
	2	1,79	± 0,06	^d	2,41	± 0,05	^a	2,05	± 0,00	^c	2,16	± 0,00	^{bc}	2,3	± 0,1	^{ab}	2,39	± 0,06	^a
	3	1,82	± 0,06	^c	2,15	± 0,00	^b	1,82	± 0,05	^c	2,35	± 0,00	^a	2,2	± 0,1	^b	2,28	± 0,06	^{ab}
K	1	1,49	± 0,05	^c	1,98	± 0,05	^b	2,37	± 0,06	^a	2,38	± 0,06	^a	1,96	± 0,00	^b	*	± *	
	2	1,75	± 0,01	^d	2,1	± 0,1	^c	2,41	± 0,06	^{ab}	2,58	± 0,06	^a	2,2	± 0,1	^{bc}	2,19	± 0,05	^c
	3	1,93	± 0,02	^d	2,31	± 0,05	^c	2,80	± 0,06	^a	2,91	± 0,06	^a	2,55	± 0,00	^b	2,55	± 0,00	^b
L	1	1,61	± 0,07	^e	1,96	± 0,00	^d	2,25	± 0,00	^c	2,16	± 0,01	^c	2,72	± 0,06	^a	2,55	± 0,00	^b
	2	1,51	± 0,06	^d	1,79	± 0,06	^{cd}	2,15	± 0,00	^{ab}	2,29	± 0,05	^{ab}	2,4	± 0,3	^a	2,03	± 0,06	^{bc}
	3	1,59	± 0,06	^d	1,89	± 0,06	^c	2,18	± 0,05	^b	2,32	± 0,05	^b	2,55	± 0,00	^a	1,9	± 0,1	^c
Biscoito tipo Amanteigado																			
M	1	2,9	± 0,1	^d	3,52	± 0,00	^c	4,26	± 0,05	^a	4,22	± 0,00	^{ab}	4,25	± 0,06	^{ab}	4,08	± 0,05	^b
	2	3,28	± 0,06	^c	4,08	± 0,05	^b	4,16	± 0,06	^{ab}	4,28	± 0,06	^a	4,2	± 0,1	^{ab}	*	± *	
N	1	1,53	± 0,06	^c	2,21	± 0,06	^b	2,34	± 0,00	^b	2,51	± 0,05	^a	*	± *		*	± *	
	2	1,60	± 0,06	^c	2,40	± 0,06	^b	2,53	± 0,01	^{ab}	2,57	± 0,06	^a	*	± *		*	± *	
	3	1,60	± 0,06	^b	2,44	± 0,01	^a	2,4	± 0,1	^a	2,57	± 0,05	^a	*	± *		*	± *	

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na linha, ao longo do tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

(*) Valores não determinados devido os biscoitos estarem fora do prazo de validade.

Pode-se verificar através da **Tabela 5** que a maior parte dos biscoitos tipo água e sal, cream cracker, maisena e amanteigado apresentaram aumento de acidez ao longo do período de estocagem, fato comprovado através da ANOVA e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança. O biscoito água e sal da marca B apresentou valor de acidez superior aos demais biscoitos do mesmo tipo, uma possível explicação para esta diferença é a qualidade dos ingredientes utilizados durante o processamento.

A legislação brasileira (BRASIL, 1978) determina que o valor de acidez em solução normal é de no máximo 2,0 mL 100 g⁻¹ biscoito. Dessa forma, somente a amostra de biscoito tipo maisena marca J, lote 1 apresentou variação de acidez ao longo do tempo dentro do estabelecido. As amostras de biscoitos de marcas e lotes (H2, H3, I2, J2, J3, K2, K3 e N1) apresentaram variação inferior ao estabelecido somente no tempo 0 e as marcas e lotes (K1, L1, L2 e L3) estão em acordo somente nos tempos 0 e 30 dias. Todas as outras marcas e lotes apresentaram valores de acidez superiores ao estabelecido ao longo do período de estocagem. É importante ressaltar que esse parâmetro visa manter o padrão de qualidade do alimento durante sua vida de prateleira. Alimentos com elevados valores de acidez podem sofrer alterações nas características organolépticas e sensoriais tornando-se impróprio para o consumo.

3.3 Índice de Peróxido

3.3.1 Validação da metodologia para determinação do índice de peróxido

3.3.1.1 Avaliação da repetitividade e precisão intermediária em biscoitos

A precisão da metodologia para a determinação de peróxidos em biscoitos foi avaliada em condições de repetitividade e de precisão intermediária pela análise de sete repetições independentes nos quatro tipos de biscoitos. O fator de variação foi a realização das análises em três dias diferentes. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores de repetitividade e precisão intermediária para determinação de peróxido em biscoitos.

Tipos de biscoito	Precisão	CV (%)	HORWITZ CV (%)
Precisão intra-dia			
água e sal (n=7)	6,9	7,7	13,2
cream cracker (n=7)	6,9	12,4	
maisena (n=7)	3,7	9,5	
amanteigado (n=7)	8,7	9,2	
Precisão inter-dias (3 dias)			
água e sal (n=3)	6,6	9,0	
cream cracker (n=3)	6,8	12,9	
maisena (n=3)	3,6	11,4	
amanteigado (n=3)	8,7	9,7	

CV(%) = coeficiente de variação;
precisão (miliequivalente de peróxido Kg⁻¹ de gordura)

Os valores médios de coeficiente de variação obtidos conforme a **Tabela 6** variaram de 7,7 a 12,4% para os tipos de biscoitos. O valor de CV calculado pela equação de Horwitz é 13,2%. Os valores de CV obtidos no ensaio de repetitividade estão próximos, porém abaixo ao CV obtido pela equação de Horwitz. Este fato pode ser explicado, pela determinação de peróxido ser uma técnica que demanda de várias etapas analíticas, que podem causar maiores possibilidades de falhas durante seu desenvolvimento.

A precisão intermediária foi avaliada por análise de variância (ANOVA) com um fator de classificação, neste caso, os dias diferentes. Os valores de F encontrados foram 1,12, 1,25, 0,19, 0,02 para os biscoitos tipo cream cracker, água e sal, amanteigado e maisena, respectivamente, conforme demonstrado na **Tabela 7**. O valor de F tabelado ao nível de confiança de 95% foi 3,55. Como os valores de F calculado são menores que F tabelado para os quatro tipos de biscoitos, conclui-se que o fator de variação não é significativo sobre a resposta.

Tabela 7. Valores da ANOVA para os diferentes tipos de biscoitos em relação ao ensaio de precisão intermediária.

Biscoito Cream Cracker					Biscoito Água e Sal				
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Inter-dias	1,690	2	0,845	1,12	Inter-dias	0,850	2	0,425	1,25
Intra-dias	13,564	18	0,754		Intra-dias	6,117	18	0,340	
Total	15,253	20			Total	6,968	20		

Biscoito Amanteigado					Biscoito Maisena				
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Inter-dias	0,289	2	0,144	0,19	Inter-dias	0,008	2	0,004	0,02
Intra-dias	13,908	18	0,773		Intra-dias	3,417	18	0,190	
Total	14,196	20			Total	3,425	20		

AQ = soma dos quadrados; *gl* = graus de liberdade; *MQ* = média da soma dos quadrados

3.3.1.2 Estimativas do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD foi estimado de acordo com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2003). Assim, o LD foi estimado através da determinação de concentrações decrescentes do analito (diluições sucessivas da amostra com concentração conhecida), a fim de verificar a menor concentração em que seria possível distinguir a amostra teste da amostra branco (aparecimento de coloração amarela). Para a realização desse ensaio a miscela obtida após extração dos lipídeos pelo método de Bligh & Dyer (1959) foi diluída com clorofórmio nas proporções 1:3 e 1:2, obtendo-se volume final igual a 12 mL. A partir dessa miscela diluída procedeu-se a reação para a determinação de índice de peróxido. As amostras diluídas na proporção 1:3 não apresentaram reação perceptível sendo considerada, portanto, uma concentração abaixo do LD. Já para a diluição 1:2 foi possível diferenciar a amostra teste da amostra branco pelo aparecimento de cor amarelada nas amostras de biscoito, indicativo da reação dos peróxidos presentes na amostra com o iodeto de potássio adicionado. Considerando que a concentração inicial das amostras de biscoito tipo água e sal, maisena, cream cracker e amanteigado foram 0,7, 1,6, 1,0 e 2,5 miliequivalentes de peróxido kg⁻¹ de gordura na amostra, respectivamente, então o valor de LD estimado para as

amostras foram 0,4, 0,8, 0,5 e 1,2 miliequivalentes de peróxido kg^{-1} gordura, respectivamente.

O LQ representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Nesse caso ocorreram dificuldades para testar o LQ para esse tipo de método, visto que não houve amostra isenta de analito, tampouco padrões dos peróxidos naturalmente presentes para serem adicionados à amostra.

3.3.2 Determinação do índice de peróxido em amostras de biscoitos.

Após a etapa de validação do método analítico para a determinação do índice de peróxido em biscoito, a etapa seguinte foi a realização da análise nas matrizes de biscoitos. Para isso, as amostras após sofrerem processo de moagem, homogeneização e pesagem foram submetidas ao processo analítico conforme descrito no item 2.7.

Os resultados de peróxidos expressos em (miliequivalente de peróxido kg^{-1} gordura) encontrados nos biscoitos tipo cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado durante a vida de prateleira estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de peróxidos (expresso em miliequivalente de peróxido kg⁻¹ de gordura) em amostras de biscoitos durante o período de estocagem.

		Dias de estocagem											
Marca	Lote	0		30		60		90		120		150	
Biscoito água e sal													
A	1	8,12 ± 0,01	^c	19,1 ± 0,3	^b	27,8 ± 0,5	^b	27,21 ± 0,00	^a	*	±	*	* ± *
	2	9,45 ± 0,01	^d	19,6 ± 0,3	^b	18,3 ± 0,5	^c	34,05 ± 0,01	^a	*	±	*	* ± *
	3	nd ±	^e	8,02 ± 0,02	^b	5,52 ± 0,00	^d	6,54 ± 0,00	^c	7,20 ± 0,00	^c	10,1 ± 0,5	^a
B	1	0,70 ± 0,00	^c	2,19 ± 0,01	^a	1,88 ± 0,00	^{ab}	1,07 ± 0,00	^c	1,6 ± 0,3	^b	1,07 ± 0,00	^c
	2	nd ±	^e	2,38 ± 0,01	^b	1,63 ± 0,00	^d	0,77 ± 0,00	^d	1,93 ± 0,00	^c	2,70 ± 0,00	^a
	3	nd ±	^d	1,98 ± 0,00	^a	1,8 ± 0,3	^a	0,77 ± 0,00	^c	1,16 ± 0,00	^{bc}	1,55 ± 0,00	^{ab}
C	1	nd ±	^c	4,11 ± 0,00	^a	nd ±	^c	1,2 ± 0,4	^b	*	±	*	* ± *
	2	nd ±	^d	nd ±	^d	3,28 ± 0,00	^a	1,8 ± 0,4	^b	1,04 ± 0,00	^c	* ± *	
	3	4,3 ± 0,3	^a	2,66 ± 0,00	^b	nd ±	^d	1,03 ± 0,00	^c	0,00 ± 0,00	^d	1,03 ± 0,00	^c
D	1	5,01 ± 0,02	^b	3,83 ± 0,00	^d	4,90 ± 0,01	^c	5,11 ± 0,00	^a	3,72 ± 0,00	^e	* ± *	
	2	3,83 ± 0,07	^d	2,99 ± 0,00	^e	6,12 ± 0,00	^b	5,32 ± 0,00	^c	8,0 ± 0,3	^a	5,80 ± 0,00	^{bc}
	3	4,86 ± 0,01	^a	2,87 ± 0,00	^b	3,14 ± 0,00	^b	1,99 ± 0,00	^c	5,2 ± 0,4	^a	* ± *	
Biscoito cream cracker													
E	1	5,5 ± 0,3	^a	3,9 ± 0,3	^b	2,83 ± 0,00	^c	6,0 ± 0,3	^a	5,37 ± 0,00	^a	* ± *	
	2	3,89 ± 0,00	^{de}	3,3 ± 0,4	^e	5,0 ± 0,4	^{cd}	5,7 ± 0,4	^c	12,7 ± 0,4	^a	7,7 ± 0,4	^b
	3	4,1 ± 0,3	^d	5,3 ± 0,3	^c	3,61 ± 0,00	^d	7,1 ± 0,3	^b	12,72 ± 0,00	^a	7,1 ± 0,3	^b
F	1	nd ±	^e	2,08 ± 0,00	^b	2,14 ± 0,00	^a	1,52 ± 0,00	^c	1,01 ± 0,00	^d	1,01 ± 0,00	^d
	2	nd ±	^d	2,20 ± 0,01	^b	2,25 ± 0,00	^a	1,07 ± 0,00	^c	nd ±	^d	1,07 ± 0,00	^c
	3	nd ±	^c	nd ±	^c	1,63 ± 0,00	^a	1,03 ± 0,00	^b	nd ±	^c	1,03 ± 0,00	^b
G	1	5,02 ± 0,00	^c	3,8 ± 0,4	^d	6,00 ± 0,00	^c	7,96 ± 0,00	^b	15,6 ± 0,4	^a	14,5 ± 0,4	^a
	2	3,36 ± 0,00	^e	5,91 ± 0,01	^d	8,49 ± 0,00	^c	12,64 ± 0,00	^b	23,3 ± 0,4	^a	* ± *	
	3	3,63 ± 0,01	^e	5,10 ± 0,02	^d	5,22 ± 0,00	^d	7,42 ± 0,00	^c	13,60 ± 0,00	^a	12,7 ± 0,4	^b
H	1	nd ±	^d	2,10 ± 0,00	^b	3,23 ± 0,00	^a	1,02 ± 0,00	^c	1,02 ± 0,00	^c	2,3 ± 0,4	^b
	2	nd ±	^c	0,98 ± 0,00	^b	2,3 ± 0,4	^a	1,92 ± 0,00	^a	1,92 ± 0,00	^a	* ± *	
	3	nd ±	^e	2,03 ± 0,00	^a	nd ±	^e	1,96 ± 0,00	^b	0,98 ± 0,00	^d	1,47 ± 0,00	^c

Tabela 8. (Continuação).

		Dias de estocagem																	
Marca	Lote	0		30		60		90		120		150							
Biscoito maisena																			
I	1	3,00	± 0,01	^{ab}	1,59	± 0,00	^d	2,4	± 0,4	^{bc}	2,05	± 0,00	^{cd}	2,05	± 0,00	^{cd}	3,07	± 0,00	^a
	2	nd	±	^d	1,63	± 0,00	^c	3,34	± 0,00	^b	2,11	± 0,00	^c	5,28	± 0,00	^a	5,5	± 0,4	^a
	3	3,20	± 0,01	^a	nd	±	^c	2,31	± 0,00	^b	1,9	± 0,4	^b	2,5	± 0,4	^{ab}	2,19	± 0,00	^b
J	1	3,77	± 0,00	^b	4,54	± 0,00	^b	3,48	± 0,00	^b	5,49	± 0,00	^b	95,1	± 10,1	^a	9,1	± 0,4	^b
	2	3,28	± 0,01	^d	5,77	± 0,00	^c	6,2	± 0,4	^c	6,71	± 0,00	^c	17,88	± 0,01	^b	19,8	± 0,4	^a
	3	4,46	± 0,00	^d	4,13	± 0,00	^d	6,03	± 0,00	^c	6,86	± 0,00	^c	22,6	± 0,4	^a	17,4	± 0,4	^b
K	1	nd	±	^c	2,06	± 0,00	^b	2,9	± 0,4	^b	2,00	± 0,00	^b	4,8	± 0,4	^a	*	± *	
	2	1,79	± 0,01	^d	2,36	± 0,00	^c	2,89	± 0,00	^b	0,91	± 0,00	^e	3,66	± 0,00	^a	3,9	± 0,3	^a
	3	nd	±	^e	2,49	± 0,00	^c	3,3	± 0,4	^b	0,96	± 0,00	^d	12,8	± 0,3	^a	3,37	± 0,00	^b
L	1	3,62	± 0,01	^a	nd	±	^b	nd	±	^b	nd	±	^b	nd	±	^b	nd	±	^b
	2	2,34	± 0,00	^b	2,8	± 0,4	^{ab}	3,5	± 0,4	^a	nd	±	^c	nd	±	^c	1,79	± 0,00	^b
	3	nd	±	^d	1,86	± 0,00	^b	2,54	± 0,00	^a	nd	±	^d	nd	±	^d	1,81	± 0,00	^c
Biscoito amanteigado																			
M	1	2,13	± 0,00	^a	nd	±	^d	1,90	± 0,00	^b	nd	±	^d	0,00	± 0,00	^d	1,80	± 0,00	^c
	2	3,4	± 0,3	^b	nd	±	^d	4,22	± 0,01	^a	2,02	± 0,00	^c	0,00	± 0,00	^d	*	± *	
N	1	4,8	± 0,4	^a	3,38	± 0,01	^b	2,47	± 0,02	^c	2,35	± 0,00	^c	*	± *		*	± *	
	2	5,25	± 0,02	^c	3,67	± 0,02	^d	14,09	± 0,09	^a	11,17	± 0,00	^b	*	± *		*	± *	
	3	6,2	± 0,3	^a	3,86	± 0,00	^b	2,45	± 0,03	^c	3,51	± 0,01	^b	*	± *		*	± *	

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=2). Médias seguidas pela mesma letra na linha, ao longo do tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

(*) Valores não determinados devido os biscoitos estarem fora do prazo de validade.

nd = não detectado

A partir dos dados obtidos e apresentados na **Tabela 8**, foi verificado que não houve um comportamento padrão nas amostras de mesmo lote para os valores de peróxido, o que foi comprovado pela ANOVA e pelo Teste de Tukey, a 95% de confiança, durante o período de estocagem.

Não existe legislação específica para valores de peróxido em biscoitos. O regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais (BRASIL, 1999) determina valor máximo de peróxido igual a 10 meq kg^{-1} , garantindo assim a qualidade do óleo. Os biscoitos analisados, de marcas e lotes E2, E3, G1, G2, G3, J1, J2, J3 e K3 apresentaram valores de peróxido superiores a 10 meq kg^{-1} no período de 120 dias, as marcas e lotes A3, G1, G3, J2 e J3 também apresentaram valores superiores no período de 150 dias, a marca e lotes A1 e A2 apresentou valor superior ao especificado em 30, 60 e 90 dias e a marca e lote N2 apresentou valor de peróxido alterado em 60 e 90 dias. Todos estes biscoitos apresentaram valores superiores ao recomendado pela ANVISA para óleos e gorduras.

3.4 Teor de lipídeos em biscoitos

Como o teor de lipídeos não deve variar durante o período de estocagem, efetuou-se somente uma análise para cada amostra. A determinação do teor de lipídeos nos biscoitos foi realizada conforme descrito no item 2.8, em triplicata e os resultados estão na **Tabela 9**.

Tabela 9. Teor de lipídeos (expresso em %) em amostras de biscoitos.

Marca	Lote	Biscoito água e sal		Marca	Lote	Biscoito cream cracker	
A	1	10,9 ±	0,2 ^a	E	1	14,4 ±	0,9 ^a
	2	10,9 ±	0,2 ^a		2	12,9 ±	0,2 ^b
	3	9,8 ±	0,1 ^b		3	13,1 ±	0,2 ^{a,b}
B	1	18,0 ±	0,2 ^a	F	1	12,7 ±	1,3 ^a
	2	16,6 ±	0,2 ^b		2	12,0 ±	0,1 ^a
	3	16,6 ±	0,1 ^b		3	12,5 ±	0,2 ^a
C	1	12,9 ±	0,1 ^a	G	1	11,3 ±	0,1 ^a
	2	12,38 ±	0,04 ^b		2	11,18 ±	0,04 ^a
	3	12,4 ±	0,1 ^b		3	10,4 ±	0,2 ^b
D	1	13,8 ±	0,4 ^a	H	1	12,6 ±	0,3 ^b
	2	13,3 ±	0,6 ^a		2	13,4 ±	0,2 ^a
	3	12,9 ±	0,7 ^a		3	13,1 ±	0,2 ^{a,b}
Marca	Lote	Biscoito maisena		Marca	Lote	Biscoito amanteigado	
I	1	12,5 ±	0,3 ^a	M	1	17,8 ±	0,3 ^a
	2	12,2 ±	0,2 ^a		2	15,9 ±	0,2 ^b
	3	11,8 ±	0,5 ^a	N	1	13,7 ±	0,1 ^b
J	1	11,7 ±	0,3 ^a		2	14,4 ±	0,4 ^a
	2	11,5 ±	0,1 ^a		3	13,7 ±	0,1 ^b
	3	11,2 ±	0,2 ^a	K	1	12,8 ±	0,2 ^a
K	2	14,0 ±	0,8 ^a		2	14,0 ±	0,8 ^a
	3	13,3 ±	0,1 ^a		3	13,3 ±	0,1 ^a
L	1	10,4 ±	0,1 ^b	L	1	10,4 ±	0,1 ^b
	2	10,8 ±	0,1 ^a		2	10,8 ±	0,1 ^a
	3	10,6 ±	0,1 ^{a,b}		3	10,6 ±	0,1 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para os lotes de uma mesma marca, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

Foi verificado através da **Tabela 9**, que para alguns tipos de biscoito existe diferença significativa nos teores de lipídeos encontrados entre lotes de mesma marca. As marcas D, F, I, J e K não apresentaram diferença entre os lotes em relação aos teores de lipídeos. A tabela brasileira de composição de alimentos (TACO, 2011) aponta teores de lipídeos de 12,0 e 14,4% para os biscoitos tipo maisena e cream cracker, respectivamente. Os teores de lipídeos para os biscoitos tipo maisena e cream cracker estão de acordo com a especificação da tabela TACO, mesmo as amostras K2 e E1 encontra-se dentro do limite, o teste t de student foi aplicado a 95% de confiança e os valores encontrados foram 14,0 ±

1,4 (12,7 a 15,4)% e $14,4 \pm 1,6$ (12,8 a 15,9)%, respectivamente. Quando os valores determinados de gordura total são comparados com os declarados no rótulo dos biscoitos, todas as marcas estão em acordo com o valor declarado na rotulagem, obedecendo a legislação vigente RDC n° 360 de 23 de dezembro 2003 (ANVISA), onde os valores declarados no rótulos dos alimentos devem apresentar uma tolerância de 20% com relação aos valores de nutrientes declarados nos rótulos.

3.5 Determinação de ferro em amostras de biscoitos por FAAS.

As análises do teor de ferro nas amostras de biscoitos foram realizadas para cada embalagem, ao longo do tempo, a fim de avaliar o teor do mineral que apesar de ser estável, pode apresentar valores diferentes em razão da falta de homogeneidade das farinhas fortificadas utilizadas como ingredientes.

Os valores do teor de ferro ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) encontrados nos biscoitos tipo cream cracker, água e sal, maisena e amanteigado, estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Teor de ferro (expresso em mg 100 g⁻¹) em amostras de biscoito durante o período de estocagem.

Marca	Lote	Dias de estocagem																							
		0		30		60		90		120		150													
		Biscoito água e sal																							
A	1	6,1	±	0,1	^b	6,3	±	0,1	^{ab}	6,96	±	0,05	^a	7,0	±	0,4	^a	*	±	*	*	±	*		
	2	6,1	±	0,2	^b	6,07	±	0,04	^b	6,74	±	0,03	^a	6,76	±	0,08	^a	*	±	*	*	±	*		
	3	6,1	±	0,5	^a	6,2	±	0,3	^a	6,5	±	0,4	^a	6,9	±	0,5	^a	6,60	±	0,01	^a	6,2	±	0,1	^a
B	1	5,1	±	0,5	^a	5,1	±	0,3	^a	5,6	±	0,2	^a	5,94	±	0,03	^a	5,2	±	0,4	^a	5,1	±	0,2	^a
	2	6,7	±	0,6	^a	6,6	±	0,2	^a	6,9	±	0,7	^a	7,6	±	0,4	^a	6,6	±	0,4	^a	6,7	±	0,3	^a
	3	7,5	±	0,7	^a	7,5	±	0,5	^a	6,87	±	0,05	^a	7,4	±	0,1	^a	7,3	±	0,6	^a	7,0	±	0,2	^a
C	1	5,9	±	0,1	^a	5,1	±	0,3	^b	4,9	±	0,2	^b	5,1	±	0,2	^b	*	±	*	*	±	*		
	2	4,84	±	0,04	^a	5,8	±	0,2	^a	5,9	±	0,2	^a	5,1	±	0,8	^a	6,0	±	0,2	^a	*	±	*	
	3	5,3	±	0,2	^b	6,3	±	0,1	^a	6,4	±	0,2	^a	6,2	±	0,3	^a	6,37	±	0,05	^a	6,1	±	0,2	^a
D	1	6,0	±	0,3	^b	6,6	±	0,2	^{ab}	6,7	±	0,2	^{ab}	7,6	±	0,3	^{ab}	6,65	±	0,05	^a	*	±	*	
	2	7,1	±	0,6	^a	7,5	±	0,4	^a	8,6	±	0,2	^a	7,6	±	0,5	^a	8,1	±	0,3	^a	7,7	±	0,1	^a
	3	6,5	±	0,3	^a	7,6	±	0,4	^a	7,1	±	0,2	^a	6,79	±	0,04	^a	7,7	±	1,1	^a	*	±	*	
Biscoito cream cracker																									
E	1	6,7	±	0,2	^b	7,3	±	0,1	^{ab}	7,09	±	0,03	^{ab}	7,3	±	0,2	^a	7,6	±	0,3	^a	*	±	*	
	2	7,3	±	1,0	^a	7,5	±	0,3	^a	6,9	±	0,6	^a	8,1	±	0,4	^a	8,02	±	0,01	^a	7,1	±	0,4	^a
	3	9,2	±	0,6	^a	8,8	±	1,0	^a	7,6	±	0,3	^a	8,96	±	0,03	^a	8,9	±	0,3	^a	8,69	±	0,02	^a
F	1	5,0	±	0,3	^b	5,9	±	0,2	^a	5,39	±	0,04	^{ab}	5,30	±	0,02	^{ab}	5,27	±	0,04	^{ab}	5,34	±	0,04	^{ab}
	2	5,31	±	0,03	^b	5,6	±	0,5	^b	5,7	±	0,1	^b	5,3	±	0,1	^b	5,5	±	0,2	^b	7,0	±	0,1	^a
	3	6,5	±	0,2	^a	6,57	±	0,03	^a	6,75	±	0,05	^a	6,6	±	0,2	^a	6,6	±	0,3	^a	6,9	±	0,7	^a
G	1	6,0	±	0,1	^b	6,1	±	0,1	^{ab}	6,4	±	0,1	^{ab}	6,37	±	0,06	^{ab}	6,6	±	0,3	^a	6,13	±	0,04	^{ab}
	2	6,9	±	0,4	^a	6,4	±	0,4	^a	6,50	±	0,07	^a	6,8	±	0,2	^a	6,3	±	0,3	^a	*	±	*	
	3	7,3	±	1,2	^a	6,2	±	0,2	^a	6,49	±	0,03	^a	6,77	±	0,03	^a	6,67	±	0,07	^a	6,6	±	0,1	^a
H	1	4,8	±	0,1	^a	5,0	±	0,3	^a	4,93	±	0,08	^a	5,1	±	0,2	^a	5,4	±	1,1	^a	4,9	±	0,1	^a
	2	5,31	±	0,05	^b	5,66	±	0,04	^a	5,44	±	0,04	^{ab}	5,44	±	0,09	^{ab}	5,6	±	0,2	^{ab}	*	±	*	
	3	5,2	±	0,3	^a	5,6	±	0,4	^a	5,31	±	0,03	^a	5,5	±	0,3	^a	5,45	±	0,03	^a	5,7	±	0,7	^a

Tabela 10. (Continuação)

Marca	Lote	Dias de estocagem																							
		0		30		60		90		120		150													
		Biscoito maisena																							
I	1	6,6	±	0,2	^a	6,8	±	0,1	^a	7,2	±	0,4	^a	7,0	±	0,2	^a	6,4	±	0,3	^a	6,7	±	0,8	^a
	2	5,4	±	0,2	^a	5,4	±	0,3	^a	5,6	±	0,2	^a	5,5	±	0,3	^a	5,01	±	0,06	^a	5,0	±	0,1	^a
	3	4,3	±	0,4	^a	3,71	±	0,00	^a	4,3	±	0,2	^a	3,7	±	0,1	^a	4,2	±	0,2	^a	4,2	±	0,3	^a
J	1	5,2	±	0,4	^a	5,3	±	0,1	^a	5,8	±	0,1	^a	5,7	±	0,2	^a	5,2	±	0,1	^a	4,9	±	0,1	^a
	2	5,3	±	0,1	^a	5,1	±	0,2	^a	5,4	±	0,3	^a	5,22	±	0,04	^a	5,31	±	0,03	^a	5,1	±	0,2	^a
	3	5,1	±	0,2	^b	5,8	±	0,3	^a	5,47	±	0,00	^{ab}	5,3	±	0,1	^{ab}	5,6	±	0,2	^{ab}	4,95	±	0,05	^b
K	1	3,7	±	0,1	^b	3,9	±	0,1	^{ab}	4,3	±	0,1	^a	3,80	±	0,00	^b	3,7	±	0,2	^b	*	±	*	
	2	3,9	±	0,2	^{bc}	4,0	±	0,2	^{abc}	4,58	±	0,01	^a	4,43	±	0,08	^{ab}	4,2	±	0,2	^{abc}	3,7	±	0,2	^c
	3	4,1	±	0,2	^a	4,1	±	0,4	^a	4,5	±	0,1	^a	4,2	±	0,1	^a	4,0	±	0,2	^a	3,8	±	0,1	^a
L	1	2,43	±	0,04	^{bc}	2,7	±	0,2	^{ab}	2,98	±	0,01	^a	2,7	±	0,2	^{ab}	2,7	±	0,1	^{ab}	2,13	±	0,01	^c
	2	2,2	±	0,1	^b	2,4	±	0,1	^{ab}	3,2	±	0,4	^a	2,6	±	0,1	^{ab}	2,7	±	0,6	^{ab}	2,07	±	0,01	^b
	3	2,30	±	0,03	^{ab}	2,8	±	0,5	^a	2,7	±	0,1	^{ab}	2,49	±	0,09	^{ab}	2,5	±	0,2	^{ab}	2,03	±	0,02	^b
Biscoito amanteigado																									
M	1	5,5	±	0,4	^a	5,6	±	0,5	^a	5,98	±	0,02	^a	5,7	±	0,8	^a	6,06	±	0,01	^a	5,5	±	0,2	^a
	2	3,5	±	0,3	^a	3,4	±	0,5	^a	3,9	±	0,4	^a	3,6	±	0,3	^a	3,9	±	0,4	^a	*	±	*	
N	1	4,0	±	0,6	^a	3,8	±	0,3	^a	4,1	±	0,1	^a	4,63	±	0,04	^a	*	±	*		*	±	*	
	2	3,8	±	0,2	^a	3,8	±	0,7	^a	4,31	±	0,02	^a	4,2	±	0,4	^a	*	±	*		*	±	*	
	3	4,1	±	0,3	^a	4,2	±	0,2	^a	4,58	±	0,09	^a	4,54	±	0,02	^a	*	±	*		*	±	*	

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=2). Médias seguidas pela mesma letra na linha, ao longo do tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95%).

(*) Valores não determinados devido os biscoitos estarem fora do prazo de validade.

De acordo com a **Tabela 10**, os valores de ferro não variaram de uma embalagem para outra, para a maioria das marcas, exceção ocorreu para as marcas e lotes (A1, A2, C1, C2, D1, E1, F1, F2, G1, H2, J3, L1, L2 e L3) que apresentaram variação no teor de ferro, fato que não deveria ter ocorrido, pois todas as marcas pertenciam ao mesmo lote. Provavelmente essa diferença se deve à falta de homogeneidade nas farinhas fortificadas com ferro utilizadas como ingrediente para elaboração de alimentos.

Não existe legislação específica para teores de ferro em biscoito, a tabela TACO (2011) especifica que biscoitos tipo maisena e cream cracker devem conter 1,8 e 2,2 mg de ferro por 100 g⁻¹ de biscoito, respectivamente. Para os outros dois tipos de biscoitos não há relatos sobre o teor de ferro. Nenhuma das amostras analisadas apresentou resultados inferiores quando comparado com os valores da tabela em questão, ao contrário, apresentaram valores superiores ao apresentado pela tabela TACO. Porém, os dados mostrados nessa tabela de composição de alimentos foram obtidos antes do programa de fortificação em farinhas. A grande maioria dos biscoitos analisados apresentaram teores de ferro acima do esperado para farinha de trigo. Cabe ressaltar que a ingestão de ferro é importante para as funções do organismo, mas o excesso desse elemento pode ser prejudicial à saúde.

Verificou-se de maneira geral, que os valores de umidade encontrados nas diferentes amostras de biscoitos, de diferentes tipos e marcas, não seguiram nenhum tipo de padrão. O mesmo foi observado para as determinações de acidez, índice de peróxido e teor de lipídeos.

Não foi observado nenhum tipo de correlação entre a umidade e os valores de acidez presente nas matrizes, o que seria de se esperar. Da mesma maneira, não foi verificada nenhuma correlação entre o índice de peróxido e o teor de ferro. Para afirmar se o ferro pode ou não influenciar no processo de oxidação dos lipídeos presente nos biscoitos são necessários mais estudos com a utilização de farinhas não fortificadas e comparar com biscoitos elaborados com farinhas adicionadas de ferro.

As variações observadas para os valores de todas as análises realizadas podem ser principalmente à dificuldade de se encontrar amostras com tempo de fabricação próximo de zero. As matrizes avaliadas apresentavam de 2 a 4 meses de estocagem quando as primeiras análises foram realizadas.

4. Conclusão

As metodologias empregadas para determinação de umidade, acidez álcool solúvel, índice de peróxido em biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada com ferro foram consideradas adequadas para a realização das análises, baseado nos valores obtidos nos parâmetros avaliados.

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que houve variação nos parâmetros físico-químicos analisados (umidade, acidez, peróxido) durante o período de estocagem de 150 dias. Para o teor de lipídeos foi verificado que o mesmo encontra-se em acordo com o declarado no rótulo e que existe diferença significativa no teor de lipídeos entre lotes de mesma marca para algumas marcas. Foi verificado que o teor de ferro presente nos biscoitos não variou de uma embalagem para outra para a maioria das marcas.

Com base nos resultados obtidos, notou-se que há necessidade de melhorar a estabilidade dos componentes do biscoito, a fim de manter um padrão de qualidade uniforme durante todo o período de validade desse alimento, garantindo assim à ingestão adequada de nutrientes a população.

5. Referências Bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA 12, **1978**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 482, **1999**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 344, **2002**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 360, **2003**. www.anvisa.org.br Consulta em 02/06/2012.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis, 15th Ed, vol. 2, **1990**. Association of the Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists / William Howitz, editor ; George W. Latimer, Jr., assistant editor Gaithersburg, Maryland, 2006. 18th Ed.

AUST SD, MILLER DM. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. *In* Probst GS, Vodick MJ, Dorato MA (eds): New horizons in molecular toxicology: a symposium. Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology ; p. 29 - 34, **1991**.

BARBOSA L. F., MEDEIROS M. H.G. OHARA, A. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes, Química Nova, v. 29 (6), p. 1352 – 1360, **2006**.

BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, M. L. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, Revista de Nutrição., v. 12(2), p. 123 - 130, **1999**.

BLIGH E.G. , DYER W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification, Can J. Biochem. Physiol v. 37, p. 911 - 917, **1959**.

BORG, D.C., SCHAICH, K.M. Iron and iron-derived radicals. *In* Halliwell B (ed): *Oxygen radicals and tissue injury*. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; p. 27 - 29, **1987**.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.

BRASIL, 2007. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24. Anexo II: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Diário Oficial, nº 138, jul. 2009.

BRASIL, 2010. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2010**.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1. ed. São Paulo: Manole, v. 1. 878 p. **2005**.

GUTKOSKI, L.C.; BONAMIGO, J. M. A.; TEIXEIRA, D. M. F., PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v. 27(2), p. 355 - 363, **2007**.

HORWITZ, L. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. Analytical Chemistry, 54, 67A, **1982**.

HUMA, N., REHMAN, S.U., AWAN, J.A., MURTAZA, M.A., ARSHAD, M.U. Effect of packaging material on the quality of iron-fortified wholemeal flour during storage. Journal of Food Processing and Preservation, v 31, 659 - 670, **2007**.

HURRELL, R.F. Preventing iron deficiency through food fortification. Nutrition Review, v. 55, p. 210 - 222, **1997**.

PASCHOAL, J.A.R. E RATH, S., AIROLDI, F.P.S. E REYES, F.G. R., Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Química Nova, v. XY, 00, 1-x, **2008**.

PIZZINATTO, A. Qualidade da farinha de trigo: conceito, fatores determinantes e parâmetros de avaliação e controle. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.72. **1999**.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, **1998**.

SILVA, R.C. et al. Estabilidade oxidativa e sensorial de farinhas de trigo e fubá irradiados, Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, n.02, p. 406-413, abr./jun. **2010**.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO) / NEPA – UNICAMP - 4 ed. revisada e ampliada, Campinas, 161 p, **2011**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Worldwide prevalence of anaemia, 1993 – 2005, p. 51.

WORWOOD M., EVANS W.D., VILLIS R.J. & BURNETT A.K., Iron absorption from a natural mineral water. Clinical Laboratory Haematology. v. 18, p. 23 – 27, **1996**.

CONCLUSÕES GERAIS

O método utilizado para determinação de ferro por FAAS em biscoitos elaborados com farinha de trigo fortificada mostrou-se eficiente e adequado ao uso, baseado nos parâmetros de validação e pela avaliação de carbono residual. As metodologias empregadas para determinação de umidade, acidez álcool solúvel, índice de peróxido e teor de lipídeos apresentaram valores satisfatórios nos parâmetros avaliados e foram consideradas apropriadas ao uso.

Os valores encontrados para o teor de ferro nos biscoitos, utilizando a técnica (FAAS), indicaram que existe diferença significativa entre lotes de mesma marca e também entre marcas do mesmo tipo. Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados foi possível verificar que houve variação nos valores de umidade, acidez, peróxido e teor de ferro durante o período de análise de 150 dias.

Com base nos resultados obtidos, nota-se, a necessidade de uma legislação mais específica para o programa de fortificação de farinha de trigo com ferro, e valores esperados para alimentos que a utilizam como ingredientes a fim de garantir a avaliação e alcance dos objetivos da campanha de fortificação. Verificou-se também, que há necessidade de melhorar a qualidade dos ingredientes utilizados para a elaboração dos biscoitos a fim de manter um padrão de qualidade uniforme durante todo o período de validade desse tipo de alimento.